

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra antropologie a genetiky člověka**



**Molekulárně genetická analýza
u pacientů s podezřením na kryptické přestavby**

**Molecular Genetic Analysis
in Patients Suspected of Cryptic Rearrangements**

Diplomová práce

Bc. Roman Šolc

Vedoucí diplomové práce : RNDr. Kateřina Hirschfeldová, Ph.D.

PRAHA 2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci sepsal samostatně a že veškerá použitá literatura je řádně citována.

v Praze dne 30. 8. 2010

Roman Šolc

Podpora

Tato práce byla vypracována v rámci výzkumu a diagnostické činnosti laboratoře molekulární diagnostiky Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice, finančně byla částečně podpořena grantem IGA MZ NS/10327 – 3.

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval své školitelce, dr. Kateřině Hirschfeldové, za věnovaný čas a velkou ochotu při odborném vedení práce, doc. Alici Baxové za poskytnutí klinických dat a další spolupráci a celému kolektivu laboratoře molekulární diagnostiky (zejména ing. Věře Kobrdlové, ing. Aleši Hořínkovi a mgr. Zdeňku Musilovi) za velkou pomoc při pronikání do světa technologií molekulární genetiky a zejména za nezměrnou trpělivost.

Na závěr bych rád poděkoval všem svým blízkým za všestrannou pomoc a podporu.



Motto

„CAUSA LATET, VIS EST NOTISSIMA.“

„Příčina je skryta, výsledek je všeobecně známý.“

Publius Ovidius Naso

Abstrakt

„Kryptické přestavby“ je označení takových chromozómových přestaveb, které nelze odhalit s použitím cytogenetického pruhování metafázních chromozómů, tedy o velikosti menší než 3 – 5 Mb, a proto se k jejich detekci využívají moderní molekulárně cytogenetické metody. Čím dál více se prokazuje významná role kryptických přestaveb v lidské patologii. S použitím metody multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) jsme vyšetřili soubor 50 probandů s idiopatickou mentální retardací. U 8 probandů (16 %) byla detekována kryptická přestavba, u 6 z nich prokazatelně kauzální. Dále jsme vyšetřili soubor 40 probandů pro podezření na patologii genu SHOX. U 17 probandů (42,5 %) byla detekována kryptická přestavba, u 8 z nich prokazatelně kauzální. Výskyt malé delece nalezně izolovaně u 7 probandů byl prověřen u populačního souboru, avšak bez jednoznačného výsledku. Provedena byla rovněž mutační analýza genu SHOX.

Klíčová slova

kryptické chromozómové přestavby, mikrolece, mikroleční syndrom, mentální retardace, patologie genu SHOX, molekulární cytogenetika, multiplex ligation-dependent probe amplification

Abstract

Such chromosomal rearrangements, which cannot be detected by using of cytogenetic banding of metaphase chromosomes, i.e. chromosomes smaller than 3 – 5 Mb, and therefore modern molecular genetic methods are used to detect them, are called “cryptic rearrangements“. Their important role in human pathology is more and more significant. By using of the multiplex ligation-probe dependent amplification method (MLPA) we examined a group of 50 probands with idiopathic mental retardation. A cryptic rearrangement was found at 8 probands (16 %), at 6 of them it was demonstrably causal. Then we examined a group of 40 probands suspected of gene SHOX pathology. A cryptic rearrangement was found at 17 probands (42.5 %) and at 8 of them it was demonstrably causal. Presence of small deletion founded isolated at 7 probands was verified in a population set, but without a positive result. An analysis of mutations was made too.

Keywords

cryptic chromosomal rearrangements, microdeletion, microdeletion syndrome, mental retardation, SHOX gene pathology, molecular cytogenetics, multiplex ligation-dependent probe amplification

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Literární přehled.....	9
2.1 Kryptické přestavby.....	9
2.1.1 Obecná charakteristika kryptických přestaveb.....	9
2.1.2 Vznik mikrolecí a mikroduplikací.....	9
2.1.3 Historický vývoj.....	11
2.2 Kryptické přestavby asociované s mentálními retardacemi.....	13
2.2.1 Mentální retardace.....	13
2.2.2 Mikroleční syndromy.....	15
2.3 Gen SHOX a jeho patologie.....	16
2.3.1 Charakteristika genu SHOX.....	16
2.2.2 Patologie genu SHOX.....	19
3. Materiál.....	22
3.1 Soubor pacientů.....	22
4. Metody.....	24
4.1 Multiplex ligation-dependent probe amplification.....	24
4.1.1 Charakteristika metody.....	24
4.1.2 Použití metody MLPA.....	25
4.2 Sekvence.....	27
4.2.1 Amplifikace exonů metodou klasické PCR.....	27
4.2.2 Sekvenační reakce metodou asymetrické PCR s použitím ddNTP...	28
4.2.3 Přечиštění a sekvenace.....	28
4.3 Real-time PCR.....	29
4.3.1 Charakteristika metody.....	29
4.3.2 Použití metody real-time PCR.....	29
5. Výsledky a diskuse.....	30
5.1 Mikroleční syndromy.....	30
5.1.1 Souhrnné výsledky.....	30
5.1.2 Charakteristika probandů s pozitivním nálezem.....	31
5.1.2.1 Proband 4A.....	31
5.1.2.2 Proband 6A.....	33

5.1.2.3 Proband 20A.....	35
5.1.2.4 Proband 21A.....	37
5.1.2.5 Proband 22A.....	39
5.1.2.6 Proband 35A.....	41
5.1.2.7 Proband 44A.....	43
5.1.2.8 Proband 49A.....	45
5.1.2.9 Negativní kontroly.....	47
5.1.3 Shrnutí.....	49
5.2 Patologie genu SHOX.....	50
5.2.1 Souhrnné výsledky.....	50
5.2.2 Charakteristika probandů s pozitivním nálezem.....	51
5.2.2.1 Proband 1B.....	51
5.2.2.2 Proband 2B.....	52
5.2.2.3 Proband 6B.....	53
5.2.2.4 Proband 8B.....	54
5.2.2.5 Proband 10B.....	55
5.2.2.6 Proband 11B.....	56
5.2.2.7 Proband 12B.....	57
5.2.2.8 Proband 13B.....	58
5.2.2.9 Proband 16B.....	59
5.2.2.10 Proband 17B.....	60
5.2.2.11 Proband 18B.....	61
5.2.2.12 Proband 19B.....	62
5.2.2.13 Proband 20B.....	63
5.2.2.14 Proband 21B.....	64
5.2.2.15 Proband 24B.....	65
5.2.2.16 Proband 33B.....	66
5.2.2.17 Proband 34B.....	67
5.2.2.18 Negativní kontroly.....	68
5.2.3 Sekvence a varianty.....	69
5.2.3.1 Exon 1.....	69
5.2.3.2 Exon 2.....	70
5.2.3.3 Exon 3.....	72

5.2.3.4 Exony 4 a 5.....	73
5.2.3.5 Exon 6a.....	74
5.2.3.6 Exon 6b.....	75
5.2.4 Populační studie.....	76
5.2.5 Indikační protokol.....	78
5.2.6 Shrnutí.....	79
6. Závěr.....	81
Použité zkratky.....	82
Citovaná literatura.....	83
Přílohy.....	89
č.1 – Mikrodeleční syndromy.....	89
č.2 – Informovaný souhlas.....	92
č.3 – Protokol MLPA.....	93
č.4 – Protokol klasické PCR.....	95
č.5 – Protokol asymetrické PCR (sekvenační reakce).....	100
č.6 – Protokol přečištění vzorků k sekvenaci.....	101
č.7 – Protokol real-time PCR.....	102
č.8 – Pacietní vyšetření pro podezření na mikrodeleční syndrom.....	103
č.9 – Pacietní vyšetření pro podezření na poruchu genu SHOX.....	106
č.10 – Vyšetření referenční skupiny.....	109
č.11 – Indikační protokol.....	113

1. Úvod

Chromozómové přestavby lidského genomu mohou mít velmi variabilní projevy. Některé mohou přinést klinicky významný, patologický fenotyp, jiné se neprojeví žádnou abnormalitou a můžeme je tedy chápat jako přirozené polymorfismy. V poslední době se stále větší pozornost věnuje kryptickým přestavbám, které mohou hrát významnou roli v lidské patogenezi.

Tato práce se věnuje kryptickým přestavbám, které jsou jednak příčinou komplexních postižení (syndromů) zahrnujících mentální retardace, a a jednak těch, které jsou lokalizovány do pseudoautozomálního regionu chromozómů X a Y (PAR1) a často zasahují klinicky významný gen SHOX nebo jeho regulační oblasti. Cílem této práce je zachytit zejména pomocí metody MLPA ze souboru pacientů ty, kteří jsou postiženi kryptickou přestavbou, popsat je a jejich případné genotypo-fenotypové korelace a porovnat s publikovanými případy a studiemi. V případě genu SHOX bude provedena také mutační analýza. Praktickým výstupem této práce využitelným v klinické praxi bude také „indikační dotazník“, který usnadní výběr pacientů, kteří by měli být vyšetřeni pro podezření na patologii genu SHOX.

Výsledky této práce mohou najít uplatnění v oblasti klinické genetiky (indikace, diagnostika, kazuistiky), metodiky práce s DNA a v rámci studia lokalizace, funkce a patologií zasažených genů a jejich regulačních oblastí.

2. Literární přehled

2.1 Kryptické přestavby

2.1.1 Obecná charakteristika kryptických přestaveb

„Kryptické přestavby“ je označení takových chromozómových přestaveb (chromozómových aberací), které nelze odhalit s použitím cytogenetického pruhování metafázních chromozómů. Tato metoda (resp. soubor různých pruhovacích metod) klasické cytogenetiky je totiž omezena svou rozlišovací schopností. Nejmenší přestavby, které bývají pomocí pruhování zjistitelné, mívají rozsah 5 – 8 Mb (Salman et al., 2004). O něco lepších výsledků lze dosáhnout použitím méně spiralizovaných profázních chromozómů (tzv. high resolution banding) (Yunis 1981 in Krantz et Spinner, 2007). Kryptické přestavby bývají tedy často popisovány jako přestavby menší než 3 – 5 Mb a může se jednat o přestavby všeho druhu – delece, duplikace, translokace atd. Označují se většinou jako „mikrodelece“, „mikroduplikace“ apod. Zachytitelné jsou pomocí technik molekulární genetiky a cytogenetiky. Z klinického hlediska jsou významné a zajímavé zejména mikrodelece, které jsou podle dnešních poznatků asociovány s mnoha komplexními postiženími nezřídka zahrnujícími mentální retardace.

2.1.2 Vznik mikrodelecí a mikroduplikací

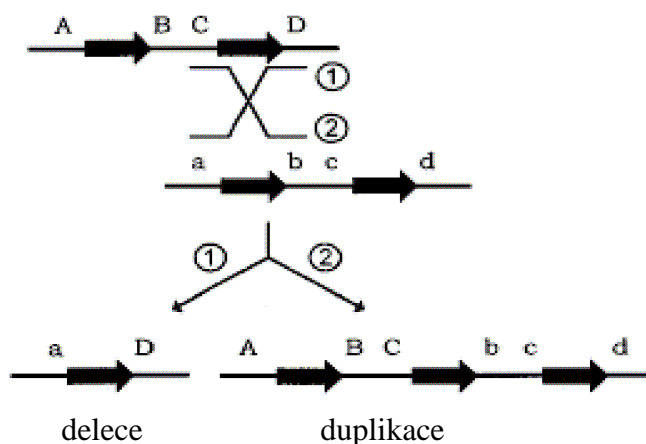
Mikrodelece s fenotypovým projevem byly pozorovány na dlouhých i krátkých raménkách téměř všech lidských chromozómů (Ballif et al., 2007; de Vries et al., 2003). Přestože mikrodelece či reciproké mikroduplikace mohou vznikat kdekoli v genomu, pozorujeme je v některých oblastech výrazně častěji, a naopak v jiných regionech nebyly dosud zachyceny. Jde pravděpodobně o oblasti, jež kódují životu nezbytné faktory a jejichž delece je nejspíš letální. (Brewer et al., 1998)

Mikrodelece a reciproké mikroduplikace vznikají jako důsledek rekombinace či nondisjunkce v průběhu mitózy. Často k ní dochází postfertilizačně, jen v některé z buněk velmi raných stádií vývoje zárodku, což vede k mozaicismu (Matthews, 1999). Druhou možností je vznik v důsledku inekválních crossing-overů mezi sesterskými chromatidami

(intrachromozómový) nebo mezi homologními chromozómy (interchromozómový) v průběhu meiózy (Shaffer et Lupski, 2000). Postižené jsou potom všechny buňky nového organismu.

K přestavbám dochází většinou rekombinací mezi bloky tzv. LCR (low copy repeats), jež často sdílejí více než 97 % homologií (Shaffer et al., 2007), bývají bohaté na CG páry (Chandley, 1989) a jsou roztroušeny po specifických oblastech genomu. Mikrodelece a mikroduplikace vznikající výše uvedeným mechanismem mívají velmi podobný rozsah i body zlomu (73 % mikrodelecí, 82 % mikroduplikací), odlišné mechanismy produkují mikrodelece a mikroduplikace výrazně variabilnější velikosti (Shaffer et al., 2007). Shodné body zlomu a shodný rozsah lze pozorovat u převážně většiny intersticiálních mikrodelecí (Shaffer et Lupski, 2000).

Bloky LCR mají kromě homologie společnou i velikost typickou pro konkrétní region genomu (od 10 do 400 kb) a vzdálenost mezi jednotlivými bloky repete. V průběhu evoluce vznikaly nejspíše duplikací chromozómových segmentů. (Shaffer et Lupski, 2000)



Obrázek 1

Mechanismus vzniku delece a reciproké duplikace prostřednictvím LCR

– převzato z Shaffer et Lupski, 2000

Horizontální linky znázorňují chromozómy obsahující bloky homologních LCR (tlusté šipky). Písmena „A,B,C,D“ a „a, b, c, d“ znázorňují unikátní sekvence lemující repete na homologních chromozómech. Rekombinací (např. nekvální crossing-over) dochází k deleci (1) a reciproké duplikaci (2).

Zvýšená pozornost se věnuje terminálním a intersticiálním mikrodelecím v subtelomerických oblastech, které se stávají častěji objektem přestaveb než ostatní části chromozómů (Mefford et Trask, 2002) a jsou velmi bohaté na geny (Saccone et al., 1992).

Každý lidský chromozóm je zakončen 3 – 20 kb specifických repetitivních sekvencí (TTAGGG)_n (Moyzis et al., 1988). Blíže centromeře pozorujeme asi 100 – 300 kb dlouhé tzv. TAR (telomere associated repeats), organizované do bloků, přičemž distálněji jsou umístěny krátké bloky (pod 2 kb), zatímco proximálněji delší (10 – 40 kb) (Flint et al., 1997). Tyto repete tvoří polymorfismy, tzv. CNV (copy number variation). Zatímco kratší distální bloky jsou sdíleny mnoha chromozómy, delší proximální jsou více specifické. U některých chromozómů jsou sekvence stejné, jiné chromozómy naopak žádné sekvenční repete neobsahují. Je tedy pravděpodobné, že tyto polymorfismy vznikly evolučně rekombinacemi mezi nehomologními chromozómy. (Shaffer et Lupski, 2000)

Proximální a distální repete navzájem neinteragují (na nehomologních ani na homologních chromozómech); naopak různými způsoby interagují s korespondujícími repetitivy na nehomologních chromozómech (Flint et al., 1997). Tak dochází k reciprokým (translokace) i nerekiprokým (terminální delecce a mikrodelecce) přestavbám (Shaffer et Lupski, 2000). Je zajímavé, že ve srovnání s intersticiálními delecemi mají terminální delecce výrazně variabilnější rozsah a body zlomu (Shaffer et Lupski, 2000).

2.1.3 Historický vývoj

Dokud bylo jedinou metodou vyšetřování lidského karyotypu cytogenetické pruhování, kryptické přestavby nemohly být odhaleny. Do poloviny osmdesátých let dvacátého století bylo popsáno množství trisomií, monosomií, delecí, duplikací, translokací, insercí, ringů a dalších přestaveb. U některých syndromů, které jsou typicky způsobované mikrodelecemi, byla dokonce prokázána cytogenetická příčina, jednalo se o pacienty vykazující delecce o rozsahu zachytitelném proužkovacími metodami (např. DiGeorgův syndrom nebo Prader-Williho syndrom). Přesto byly kryptické přestavby prozatím neodhalitelné.

K významnému metodicko-technologickému pokroku došlo v polovině osmdesátých let. Byly totiž poprvé zavedeny metody polymerázová řetězová reakce (PCR, polymerase chain reaction) a zejména fluorescenční in situ hybridizace (FISH, fluorescent in situ hybridization) (Pinkel et al., 1986). Byla to právě metoda FISH, která přemostila onu

propast mezi klasickou cytogenetikou a molekulárně biologickou analýzou DNA. Tato metoda umožnila ještě podrobnější studium chromozómů a diagnostiku malých chromozómových aberací, tedy kryptických přestaveb.

Jak od počátku devadesátých let postupovalo mapování lidského genomu, stále více FISH sond bylo dostupných jak pro výzkumné, tak pro diagnostické medicínské účely. Cytogenetické pozadí odhalovalo čím dál více klinických syndromů a onemocnění. Úskalím metody FISH (a zároveň předností) se stala právě její vysoká lokální specifita. Ještě než byla provedena hybridizace, bylo nezbytné mít velmi konkrétní představu, která oblast karyotypu má být prozkoumána, a podle toho byly vybírány vhodné sondy. To se ovšem mělo v budoucnu změnit.

Obsáhlejší použití metody FISH umožnily soubory tzv. subtelomerických sond, jež lze použít k prozkoumání subtelomerických regionů všech pacientových chromozómů najednou. Jejich zavedení bylo reakcí na hypotézu, že polymorfismy v těchto oblastech by mohly hrát roli v kryptických translokacích způsobujících u člověka patologie (Ledbetter, 1992). V dalších modifikacích metody FISH se používá jako sonda celogenomová DNA (tzv. „malovací sondy“). K nim patří tzv. mFISH (multicolour FISH) a SKY (spectral karyotyping). Sondy každého chromozómu jsou značeny specifickou kombinací fluorochromů. Pomocí počítačového programu lze poté přiřadit jednotlivým chromozómovým párům tzv. pseudobarvy, buď podle kombinace fluorochromů (mFISH), nebo na základě emisního spektra (SKY). S ohledem na kombinatoriku lze takto označit celý lidský genom s pomocí pouhých pěti fluorochromů. (Salman et al., 2004) I tyto celogenomové malovací techniky jsou ale limitovány velikostí přestaveb, které musí být větší než 2 – 3 Mb (Saracoglu et al., 2001), a navíc jsou značně finančně náročné, a tedy nepraktické pro rutinní vyšetření.

Následující vývoj poté šel k metodám jako je komparativní genomová hybridizace (CGH, comparative genomic hybridization) a její modifikace array-CGH, jež umožňují prověření celého genomu najednou (Pinkel et al., 1998; Sebat et al., 2004; Vissers et al., 2003). Obdobný potenciál má i metoda multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA, mnohočetná na ligaci závislá amplifikace sond) (Schouten et al., 2002). Rozvoj zaznamenává také využití jednonukleotidových polymorfismů (SNP, single nucleotide polymorphisms) a array-SNP (Conrad et al., 2006; Redon et al., 2006). Všechny tyto metody jsou úspěšně zaváděny do medicínsko-diagnostické i do výzkumné praxe a neustále se zdokonalují, aby bylo dosaženo maximální účinnosti, přesnosti a efektivity.

2.2 Kryptické přestavby asociované s mentálními retardacemi

Kryptické přestavby, zejména mikrolece, často vyvolávají komplexní postižení (syndromy). Většina těchto syndromů zahrnuje mezi svými fenotypovými projevy mentální retardace.

2.2.1 Mentální retardace

Mentální retardace se mohou v lidské populaci projevovat buď izolovaně, nebo ve spojení s tělesnými a faciálními dysmorfiiemi či malformacemi. Mentální retardace se vyskytuje relativně hojně, postižení jedinci tvoří přibližně 2 – 3 % populace (Vissers et al., 2003). Projevují se v různé intenzitě a jejich projevy tvoří spojitě spektrum. Možným kritériem klasifikace mentálních retardací je IQ (viz tab.1).

Tabulka 1

Klasifikace mentální retardace – převzato ze Zhang et al., 2005

stupeň retardace (hodnota IQ)		fenotyp	
		dětství	dospívání
0	normální	žádná retardace	žádná retardace
1	hraniční (<70)	normální vývoj; mírná retardace zřejmá během prvních školních let	navštěvuje běžnou školu po mnoho let; potřebuje menší nebo větší výpomoc
2	velmi mírná (<65)	normální vývoj během prvních let života; mírná retardace je od 2. – 3. roku života	navštěvuje běžnou školu po několik let; potřebuje větší výpomoc; má jednoduché schopnosti čtení, psaní a počítání
3	mírná (<50)	vývoj opožděn o několik měsíců; retardace zřejmá od 1. – 2. roku života	rozumí všemu včetně dlouhých vět; má velmi jednoduché schopnosti čtení, psaní a počítání
4	středně těžká (<35)	vývoj opožděn o mnoho měsíců; retardace zřejmá od 1. roku života	rozumí téměř všemu; používá krátké věty a mnoho znaků

5	vážná (<20)	vývoj opožděn až o rok; retardace zřejmá v průběhu 1. roku života	rozumí jednoduchým, běžným větám a jednotlivým slovům; používá věty o 2 – 3 slovech a mnoho znaků; chodí
6	velmi vážná (<10)	vývoj opožděn o několik let; retardace zřejmá do 6 měsíců života	rozumí několika slovům; obvykle chodí, někdy s podporou; nemluví nebo používá jen několik slov
7	hluboká	nemůže sedět bez pomoci ani v 5 letech	neodpovídá nebo jen málo; může sedět a stát bez pomoci; chůze je vzácná

Etiologie mentálních retardací však zůstává stále ještě do značné míry nejasná. Nejsou totiž způsobovány vždy jednou a tou samou příčinou, nýbrž mohou být následkem působení různých podnětů. U převážné většiny pacientů (různí autoři uvádějí 50 – 80 %) není základní příčina retardace vůbec známá (de Vries et al., 1997; Rauch et al., 2006). Jednou ze známých příčin jsou chromozómové aberace, různé práce je uvádějí jako kauzální příčinu u 4 – 28 % případů (de Vries et al., 1997; de Vries et al., 2003). Asi 5 – 10 % mentálních retardací je způsobováno kryptickými přestavbami (de Vries et al., 2003). Není nezajímavé, že tyto submikroskopické přestavby způsobují výrazně častěji závažné mentální retardace. U pacientů se střední a těžkou formou retardace (IQ < 50) jsou původcem u 7,4 % případů, zatímco u pacientů s mírnou formou retardace (IQ 50-70) jen u 0,5 % případů (Knight et al., 1999 in de Vries et al., 2003).

Konkrétní příčiny mentálních retardací mohou být velmi různé. Ze studie, kterou provedli Rauch et al. a jež zahrnuje 670 pacientů, plyne, že k nejčastějším příčinám patří Downův syndrom (trisomie chromosomu 21) – 9,2 % ze všech pacientů, mikrolece 22q11.2 – 2,4 %, Williamsův syndrom (mikrolece 7q11.23) – 1,3 %, syndrom fragilního X – 1,2 %, Cohenův syndrom (mutace v genu COH1 v oblasti 8q22) – 0,7 %, monosomie 1p36 (terminální mikrolece 1p36.3) – 0,6 %, Angelmannův syndrom (maternální mikrolece v oblastech 15q11 – 15q13) – 0,4 %, Coffin-Lowryho syndrom (mutace genu RPS6KA3 v oblasti Xp22.2) – 0,4 %, neurofibromatóza typu 1 (mutace genu pro neurofibromin v oblasti 17q11.2) – 0,4 % a Prader-Williho syndrom (paternální mikrolece v oblastech 15q11 – 15q13) – 0,4 %. V celkovém součtu byly mikroleční syndromy příčinou retardace u 5,3 % pacientů (Rauch et al., 2006). Mikrolece tedy

očividně hrají nezanedbatelnou roli v etiologii mentálních retardací, a proto si zaslouží odpovídající pozornost.

2.2.2 Mikrodeleční syndromy

Jak již bylo řečeno, kryptické přestavby často způsobují komplexní postižení (syndromy). Nejčastěji se jedná o tzv. mikrodeleční syndromy, které jsou způsobeny kryptickými mikrodelecemi. Internetová databáze OMIM (<http://www.ncbi.nih.gov>) registruje v současné době více než 100 mikrodelečních syndromů různého druhu a toto číslo jistě není zdaleka konečné.

Většina mikrodelečních syndromů patří mezi tzv. syndromy přilehlých genů („contiguous gene syndromes“), což znamená, že anomální fenotyp je způsoben delecí několika sousedících genů. Absence jednotlivých genů je vázána na variabilitu v rozsahu mikrodelece (obzvláště u terminálních mikrodelecí), což je jednou z příčin variability ve fenotypu pacientů.

Fenotyp zbývajících syndromů je úplně nebo takřka úplně důsledkem absence jednoho konkrétního genu, který delece zahrnuje, zatímco ostatní deletované geny se na klinickém obrazu pacienta nijak výrazně neprojeví. Fenotypový výsledek těchto syndromů tak může být shodný jak v případě delece, tak v případě závažné bodové mutace v příslušném genu.

S přihlédnutím k velké variabilitě a vzájemnému překryvu fenotypů řady mikrodelečních syndromů můžeme předpokládat, že jejich záchytnost v populaci je stále ještě podhodnocena.

(viz příloha č.1)

2.3 Gen SHOX a jeho patologie

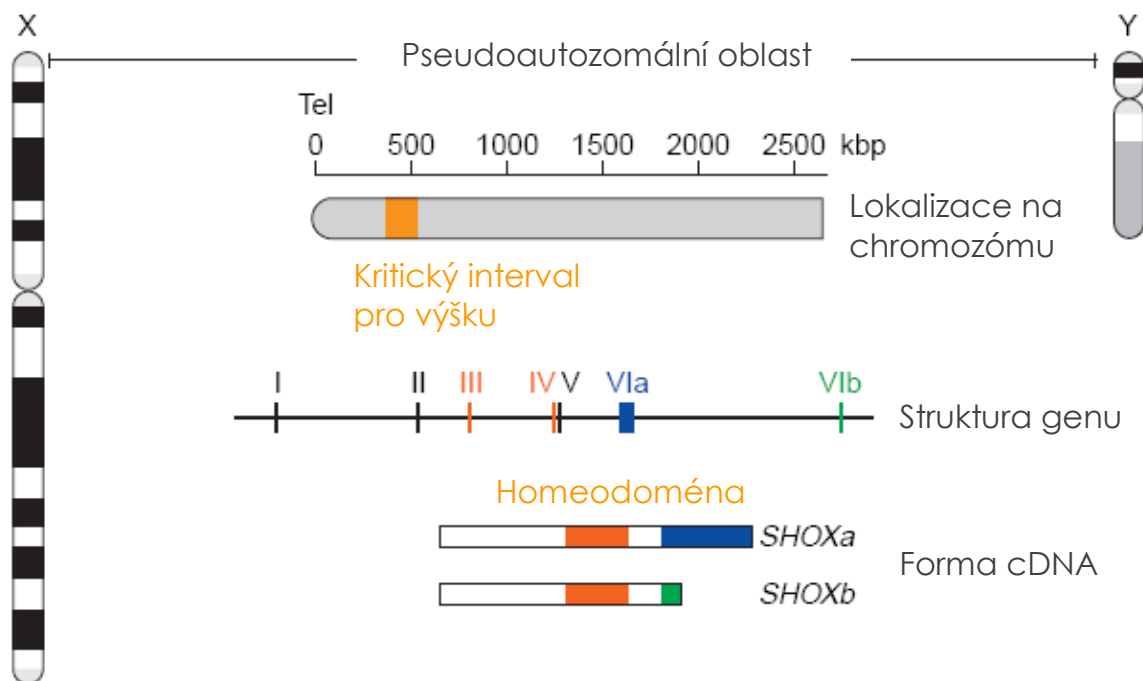
Kryptické přestavby, zejména mikrolece, mohou stát rovněž za vznikem patologií, jež nezahrnují tak široké spektrum klinických příznaků jako mikroleční syndromy. Často je přestavbou zasažen pouze jeden gen, či jeho část, případně regulační oblasti. Efekt může být srovnatelný i se zásadní bodovou mutací v takovémto genu. Příkladem takového typu patologie mohou být přestavby a mutace genu SHOX.

2.3.1 Charakteristika genu SHOX

Úvahy o existenci genu ovlivňujícím lidský vzrůst, který by byl lokalizován na chromozómu X, se poprvé objevily v souvislosti s Turnerovým syndromem a jinými patologiemi souvisejícími s defektem chromozómu X, mezi jejichž klinické manifestace spadal i malý vzrůst (Ballabio et al., 1989; Davis, 1981). Při zkoumání genotypo-fenotypových korelací u postižených jedinců bylo jako kritický region označeno distálních 700 kb chromozómu (Ogata et al., 1992; Ogata et al., 1995). Hypotetický gen byl popsán roku 1997 takřka zároveň dvěma nezávislými skupinami (Rao et al., 1997a; Rao et al., 1997b in Hintz, 2002; Ellison et al., 1997). Tento gen byl lokalizován v pseudoautosomální oblasti X a Y chromozómu (PAR1), konkrétně Xp22 a Yp11.3, a byl pojmenován „short stature homeobox-containing gene“ (SHOX). Název „pseudoautosomal homeobox-containing osteogenic gene“ (PHOG) užívaný Ellisonem et al. se již dále nepoužíval.

Vliv genu SHOX na regulaci růstu dokazovalo několik skutečností (Hintz, 2002) :

- je lokalizován v oblasti chromozómu X, která nepodléhá lyonizaci, takže je u zdravých mužů i žen exprimován ze dvou kopií
- jeho exprimace během fetálního vývoje koresponduje s růstem fétu
- sekvence je vysoce konzervativní napříč různými druhy
- ztráta nebo mutace genu je vždy spojena s malým vzrůstem (např. Turnerův syndrom, Léri-Weillův syndrom)
- nadbytek kopií genu je asociován s větším vzrůstem (např. Klinefelterův syndrom)



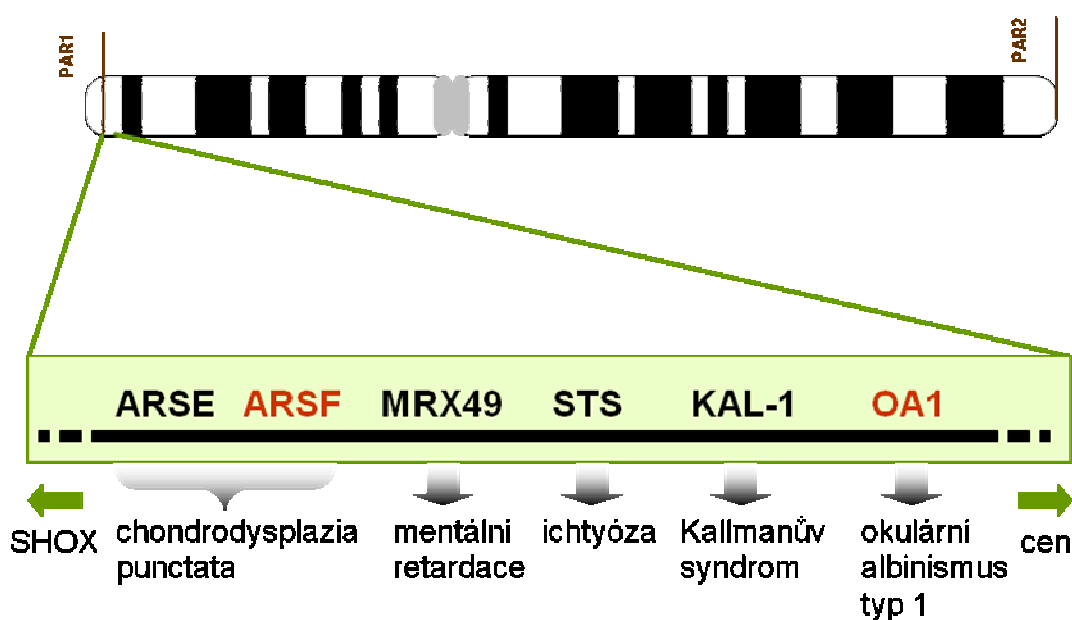
Obrázek 2

Chromozómová lokalizace, genomová struktura a formy cDNA genu SHOX

– převzato z Blaschke et Rappold, 2000

SHOX patří mezi tzv. „homeobox genes“. Homeobox tvoří sekvence o 180 bp, jež je transkribována do 60 aminokyselinové homeodomény. Tato doména tvoří motiv vázající se na eukaryotické transkripční faktory a reguluje tedy jejich aktivitu. Gen SHOX se rozkládá v regionu o velikosti přibližně 40 kb a zahrnuje jeden nekódující a šest kódujících exonů. Homeobox tvoří sekvence exonu 3 a 4. Gen podléhá alternativnímu sestřihu a mohou tak vznikat dva alternativní transkripty a to SHOXa (4559 bp) a SHOXb (1952 bp). Tyto dvě rozdílné mRNA jsou translatovány do odlišných proteinů o velikosti 292 aminokyselin a 225 aminokyselin. Alternativní sestřih se týká pouze exonu 6 (varianty 6a a 6b), zatímco v ostatních pěti exonech není v obou transkriptech rozdíl. Proteiny SHOXa a SHOXb se tedy liší pouze v C-terminální doméně (Hintz, 2002). Exony 6a a 6b kódují také různá místa podléhající fosforylaci. Rozdíl v expresi dvou variant proteinu je závislý vývojově a rovněž tkáňově. Obecně je SHOXa exprimován méně, než SHOXb. Oba jsou nejvíce exprimovány ve fibroblastech kostní dřeně. (Rao et al., 1997b in Hintz, 2002)

Gen SHOX má blízce příbuzný lidský homologní gen zvaný SHOX2 nebo SHOT („SHOX homologous gene on the chromosome three“) v oblasti 3q25-26 (Blashke et al., 1998; Semina et al., 1998). Geny SHOX a SHOX2 a jejich homology se v evoluci poprvé objevily u obratlovců. Homology SHOX2 můžeme najít u většiny obratlovců. Naopak, SHOX je vysoce konzervativní u ryb nebo slepic, ale nebyl nalezen u žab, králíků nebo hlodavců (Clement-Jones et al., 2000). Homologní gen byl popsán také u myši, a to gen Og12x (Semina et al., 1998). Homologie aminokyselin je mezi SHOX2 a Og12x dokonce výrazně větší, než mezi SHOX a SHOX2 (99 %, vs. 83 %) (Hintz, 2002). Přesto kódují SHOX, SHOX2 i Og12x identickou homeodoménu a afinita kódovaných proteinů k DNA by tedy měla být teoreticky shodná. Shodná exprese těchto genů byla pozorována v průběhu embryonálního vývoje člověka a myši (Clement-Jones et al., 2000).



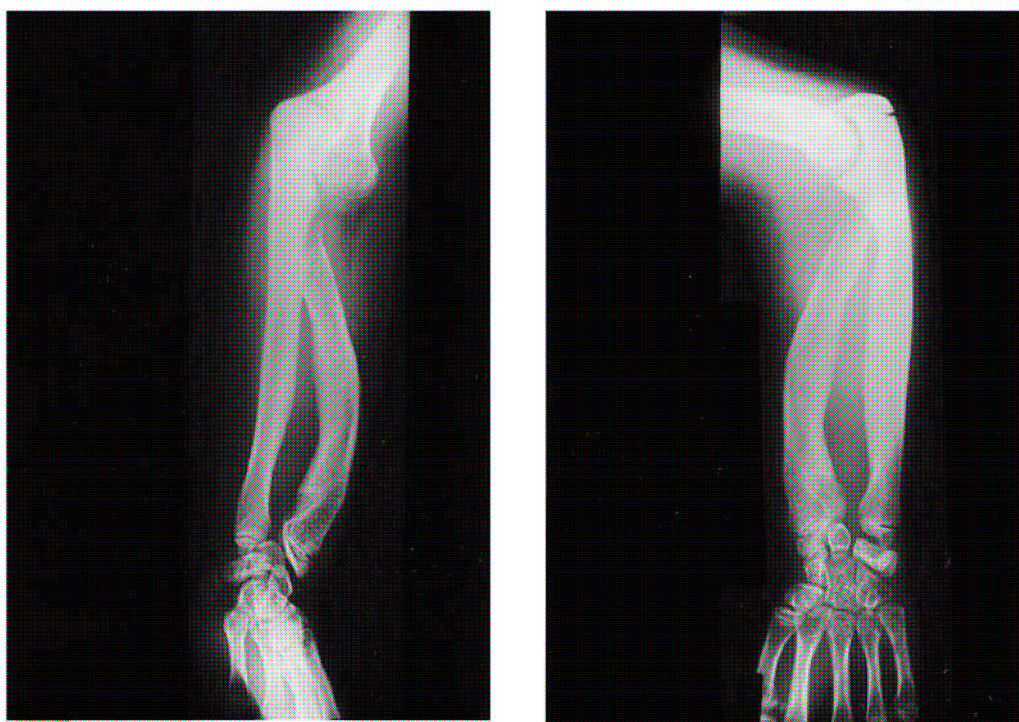
Obrázek 3

Lokalizace genů v X specifické oblasti bezprostředně za PAR1

– K. Hirschfeldová

2.3.2 Patologie genu SHOX

Klinické projevy deficiencie produktu genu SHOX vykazují značnou fenotypovou variabilitu, a to dokonce i mezi postiženými členy jedné rodiny. Obecně vzato, ženy bývají postiženy závažněji než muži. Zdá se, že u zdravých žen totiž produkty genu SHOX fungují jako antagonisté působení estrogenu (Lichtenstein et al., 1980; Ogata et al., 2001). Kromě malého vzrůstu patří mezi typické klinické projevy mesomélie (zkrácená předloktí a lýtka), cubitus valgus (vbočený loket), Madelungova deformita (zkrácená a ohnutá kost vřetení, dorsálně dislokovaná distální část kosti loketní) a zkrácené kosti metakarpální a metatarzální (Hintz, 2002). Další abnormality mohou být u pacientů odhaleny radiograficky (Hintz, 2002). Dysfunkce či absence jedné z kopií genu SHOX je spojena s Turnerovým syndromem, Léri-Weillovým syndromem (dyschondrosteózou) nebo idiopatickým malým vzrůstem. Dysfunkce či absence obou kopií s Langerovým syndromem.



Obrázek 4

Frontální a laterální rentgenový snímek dospělého pacienta s Madelungovou deformitou

– převzato z Schiller et al., 2000

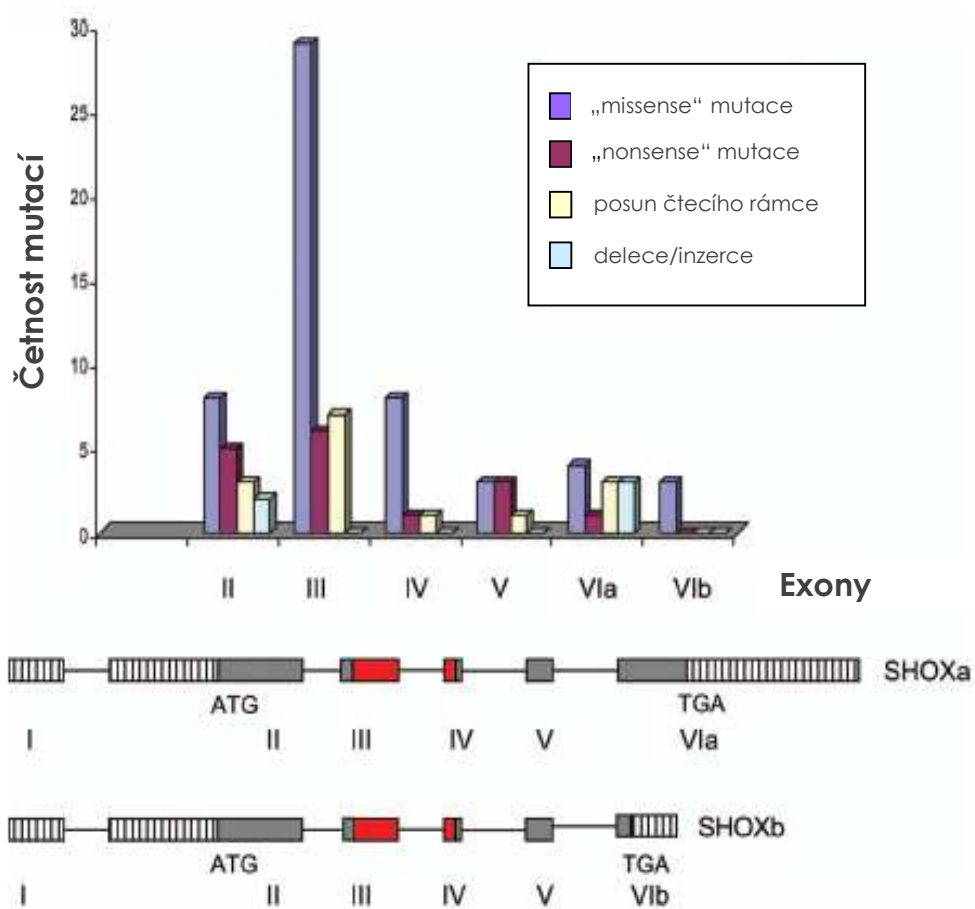
Klinický projev heterozygotní deficiencie genu SHOX byl poprvé popsán Lérím a Weillem roku 1929 jako nejčastější forma mesomelické skeletální dysplázie spojená s Madelungovou deformitou. U více než 70 % pacientů s Léri-Weillovým syndromem byla prokázána delece nebo mutace genu SHOX (Kosho et al., 1999; Ogata et al., 2002).

Langerův syndrom můžeme označit jako homozygotní podobu Léri-Weillova syndromu zahrnující extrémně snížený růst a závažné dysmorfie. Často dochází k hypoplázii nebo aplázii kosti loketní a kosti lýtkové (Kosho et al., 1999; Ogata et al., 2002).

Významnou roli hraje heterozygotní deficiencie genu SHOX pravděpodobně i v rámci Turnerova syndromu. Více než 90 % žen s Turnerovým syndromem je abnormálně malého vzrůstu a právě absentovaná kopie genu SHOX by mohla být zodpovědná za tuto složku jejich fenotypu. Ženy s Turnerovým syndromem trpí mnoha různými kostními abnormalitami, ovšem pouze u 8 % dojde k Madelungově deformitě, která je naopak pro syndrom Léri-Weill typická. Tento paradox nebyl dosud uspokojivě objasněn. (Hintz, 2002)

Syndrom idiopatického malého vzrůstu (idiopathic short stature, ISS) je charakterizován signifikantním malým vzrůstem (< -2 SDS), trvale nízkým tempem růstu a nepřítomností jiného postižení, které by mohlo být původcem (hypothyroidismus, podvýživa, deficiencie růstového hormonu). Porucha genu SHOX ovšem bude pravděpodobně původcem jen malé části takto postižených lidí. Studie Rappolda et al. provedená na 750 pacientech prokázala delecii či mutaci genu SHOX u 2,4 % postižených (Rappold et al., 2002).

Jak bylo uvedeno výše, gen SHOX může být postižen jak bodovou mutací, tak delecí většího regionu (většinou se jedná o kryptickou delecii – mikrolecii). Schiller et al. provedli studii na 32 jedincích z 18 různých německých a dánských rodin a zjistili, že rozsah delece může být velmi variabilní – od 100 kb po 9 Mb. Velikost delece nijak nekorelovala s intenzitou fenotypových projevů (Schiller et al., 2000). Delecí mohou být zasaženy také regulační oblasti genu SHOX. Jedna z takových oblastí byla odhalena ve vzdálenosti 200 – 550 kb proximálněji od 3' konce genu SHOX (Flanagan et al., 2002). Narušení regulačních oblastí zřejmě hraje významnou úlohu i u patologií mnoha jiných genů (Kleinjan et van Heyningen, 1998).



Obrázek 5

Typy bodových mutací detekované v exonech genu SHOX

– převzato z Marchini et al., 2007

Diagram znázorňuje množství různých typů bodových mutací u kódujících exonů genu SHOX. Níže jsou znázorněny alternativní transkripty SHOXa a SHOXb. Červeně je označena oblast kódující homeodoménu. Čárkované úseky nejsou translatovány.

3. Materiál

Zpracovávaným materiálem je lidská DNA izolovaná ze vzorku periferní krve odebraného do EDTA. Izolace byla provedena standardní vysolovací metodou nebo pomocí kitu pro izolaci DNA QiaGene (MiniKit). Vzorky byly odebrány pacientům indikovaným k molekulárně genetickému vyšetření z důvodu podezření na mikroleční syndrom nebo poruchu genu SHOX.

3.1 Soubor pacientů

Vyšetřovaný soubor pacientů s podezřením na mikroleční syndrom tvoří 50 nepříbuzných jedinců (probandů) s diagnostikovanou mentální nebo vývojovou retardací bez nálezu po klasické cytogenetické karyotypizaci, z toho je 28 žen (56 %) a 22 mužů (44 %). Diagnostikováni byli ve věku od 1 měsíce (3 probandi) do 15 let, nejčastěji v rozmezí od 1 roku do 5 let (30 probandů). Jedná se o pacienty v péči Oddělení lékařské genetiky (OLG) 1. lékařské fakulty UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze ve spolupráci s Klinikou dětského a dorostového lékařství (KDDL) a Neurologickou klinikou 1. lékařské fakulty UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Lékařem-specialistou indikujícím pacienty k molekulárně genetickému vyšetření byla zejména doc. MUDr. Alice Baxová, CSc., v některých případech též MUDr. Kamila Veselá. Indikace byla provedena zejména na základě diagnostikované mentální nebo vývojové retardace ve spojení s nejméně jedním z následujících symptomů : hypotonie, faciální dysmorfie, jiné vrozené vady.

Soubor pacientů vyšetřovaných kvůli podezření na poruchu genu SHOX tvoří 40 nepříbuzných jedinců (probandů), 29 žen (72,5 %) a 11 mužů (27,5 %), jimž byla diagnostikována dyschondrosteóza nebo idiopatický malý vzrůst spojený s dalšími signifikantními klinickými projevy. Diagnostikováni byli ve věku od 3 let (1 proband) do 52 let, nejčastěji v rozmezí od 10 do 16 let (22 probandů), průměrný věk v době stanovení diagnózy je 17 let. Pacienti jsou v péči Oddělení lékařské genetiky 1. lékařské fakulty UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze ve spolupráci s Oddělením lékařské genetiky Fakultní nemocnice Brno a s dalšími specializovanými, především endokrinologickými

pracovišti. Indikujícími specialisty byli doc. MUDr. Alice Baxová, CSc., MUDr. Kamila Veselá a další lékaři.

Všichni pacienti nebo jejich zákonní zástupci byli seznámeni s výzkumem a podepsali informovaný souhlas k použití DNA (viz příloha č.2).

4. Metody

4.1 Multiplex ligation-dependent probe amplification ¹

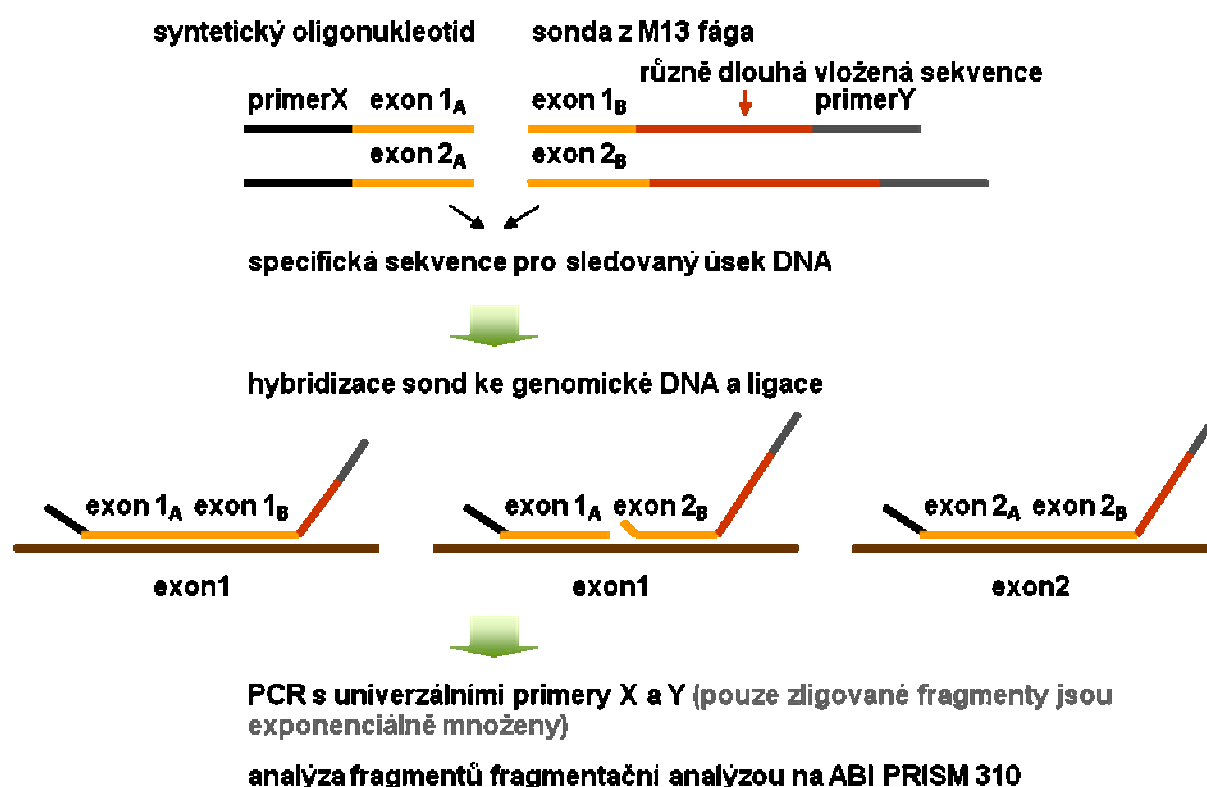
4.1.1 Charakteristika metody

Metoda multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) byla poprvé popsána Schoutenem et al. roku 2002. Je charakteristická vcelku snadným provedením a vysokou rozlišovací schopností, pomocí MLPA lze detekovat přestavby menší než 1 Mb (Rooms et al., 2006). Lze ji použít jak k podrobnému zkoumání konkrétní oblasti genomu (Fernández et al., 2005), tak k celogenomové analýze (např. všech subtelomerických oblastí) v jedné reakci (Rooms et al., 2005). Využívána je pro odhalení delecí a duplikací úseků DNA i konkrétních genů, charakterizaci dalších chromozómových aberací, detekci chromozómových aneupolidií a některých mutací, či pro výzkum nádorových buněk (Schouten et al., 2002).

Metoda MLPA je odvozena od metody polymerázové řetězové reakce (PCR). Její podstata spočívá v použití dvojice sond pro každou cílovou sekvenci. Každá sonda je složena ze dvou částí. První sonda je složená z cílové sekvence (20 – 30 nukleotidů) a ze sekvence pro synteticky připravený primer. Druhá sonda obsahuje rovněž cílovou sekvenci (25 – 43 nukleotidů) a sekvenci pro jiný syntetický primer, ovšem mezi nimi je navíc vložen variabilně dlouhý (s konkrétní délkou pro konkrétní cílovou sekvenci) náhodně sestavený fragment. Tyto sondy hybridizují s testovanou DNA, na níž nasednou těsně vedle sebe, a pomocí ligázy jsou sondy spojeny. Poté proběhne denaturace a sondy se systémem PCR amplifikují. Amplifikovaný produkt se elektroforeticky dělí, amplifikáty jednotlivých sond jsou rozlišitelné pomocí sekvencí o variabilní délce. Následuje počítačová analýza fragmentů, která vyhodnotí, jak jsou cílové sekvence ve vyšetřovaném genomu zastoupeny. (Schouten et al., 2002; Sellner et Taylor, 2004)

Nevýhodou metody MLPA je, že jejím prostřednictvím nelze například vypátrat balancované translokace (Rooms et al., 2005). Dalším nedostatkem je, že metodě MLPA můžou uniknout některé malé terminální delece, které dokáže zachytit například metoda FISH (Koolen et al., 2004).

¹ Vyšetření pro oficiální sdělení diagnózy prováděl vždy kompetentní pracovník laboratoře na základě akreditaace.



Obrázek 6

Schéma metody MLPA

– K. Hirschfeldová

4.1.2 Použití metody MLPA

Metoda MLPA byla použita k základnímu vyšetření DNA všech pacientů indikovaných jak z důvodu podezření na mikroleční syndrom, tak z důvodu podezření na poruchu genu SHOX (pro protokol viz přílohu č.3).

Pacienti s podezřením na mikroleční syndrom byli vyšetřeni pomocí SALSA MLPA kitu **P245** Microdeletion Syndromes (MRC-Holland b.v.). Tímto kitem lze prověřit oblasti autozómů, jejichž delece bývají nejčastěji asociovány s klinickými syndromy, a dvě oblasti na chromozómu X :

1p36 ... syndrom monosomie 1p36	15q11.2-12...Prader-Williho/Angelmanův syndrom
2p16.1 ... mikrolece	15q24 ... syndrom monosomie 15q
3q29 ... mikrolece	16p13.3 ... Rubinstein-Taybiho syndrom
4p16.3 ... Wolf-Hirschhornův syndrom	17q11.2 ... syndrom mikrolece NF1
5q35.3 ... Sotosův syndrom	17q21 ... mikrolece
5p15.3-25 ... syndrom Cri du chat	17p11.2 ... Smith-Magenisův syndrom
7q11.23 ... Williamsův syndrom	17p13.3 ... Miller-Diekerův syndrom
8q24.11-24.12...Langer-Giedionův syndrom	22q11.21 ... DiGeorgův syndrom
9p22.3 ... mikrolece	22q13.33 ... Phelan-McDermidův syndrom
10p15.1 ... DiGeorgův syndrom II	Xq28 ... RETT duplikace
11p13 ... Wagrův syndrom	Xp22 ... Pelizaeus-Merzbacherův syndrom
11p15.5...Beckwith-Wiedemannův syndrom	

Pokud nebyl zaznamenán pozitivní nález, byli pacienti dále vyšetřeni pomocí doplňujícího kitu SALSA MLPA kitu **P297** Microdeletion Syndromes (MRC-Holland b.v.) pro oblasti :

1q21.1 ... syndrom TAR	15q24.1 ... mikrolece
1q21.1 ... mikrolece (jiné než syndromy TAR)	16p11 ... mikrolece
3q29 ... mikrolece	17q12 ... mikrolece
7q36.1 ... autismus, schizofrenie	18q21.2 ... Pitt-Hopkins syndrome
12p11.23 ... schizofrenie	20p12.2 ... schizofrenie (duplikace)
15q13 ... mikrolece	

Současně byla provedena i analýza subtelomerických oblastí všech chromozómů pomocí SALSA MLPA kitu **P036** Human Telomere-3 (MRC-Holland b.v.).

Pro potvrzení některých nálezů byl použit také SALSA MLPA kit **P064** Microdeletion Syndromes (MRC-Holland b.v.) do oblastí :

1p36 ... syndrom monosomie 1p36	17p11.2 ... Smith-Magenisův syndrom
5q35.3 ... Sotosův syndrom	17p13.3 ... Miller-Diekerův syndrom
7q11.23 ... Williamsův syndrom	20p12.2 ... Alagilleho syndrome
7p21.2 ... Saether-Chotzenův syndrom	22q11.21 ... DiGeorgův syndrom
15q11.2-12...Prader-Williho/Angelmanův syndrom	

Pokud bylo třeba zpřesnit či doplnit nález, byli pacienti vyšetřeni ještě některým z dalších kitů, a to SALSA MLPA kitem **P250** DiGeorge (MRC-Holland b.v.) pro regiony asociované s DiGeorgovým syndromem :

22p11 ... DiGeorgův syndrom 1

10p12-p15 ... DiGeorgův syndrom 2

4q35 ... další oblast asociovaná s fenotypem DiGeorgova syndromu

8p23.1 ... další oblast asociovaná s fenotypem DiGeorgova syndromu

9q34.3 ... další oblast asociovaná s fenotypem DiGeorgova syndromu

17p13.3 ... další oblast asociovaná s fenotypem DiGeorgova syndromu

22q13 ... další oblast asociovaná s fenotypem DiGeorgova syndromu

a SALSA MLPA kitem **P018** SHOX (MRC-Holland b.v.) pro pseudoautozomální oblast PAR1 (viz níže).

Pacienti s podezřením na přestavbu v genu SHOX či v jeho blízkém okolí (prokázané i potenciální regulační oblasti) byli vyšetřeni pomocí SALSA MLPA kitu **P018** SHOX (MRC-Holland b.v.), který analyzuje PAR1 oblast X a Y chromozómu (zahrnující také gen SHOX a jeho regulační sekvence) a přilehlé X specifické sekvence mimo PAR1.

4.2 Sekvenace ²

4.2.1 Amplifikace exonů metodou klasické PCR

Metoda polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR) byla objevena a publikována roku 1971 Kjell Keppem bez většího ohlasu. Její „znovuobjevitel“ Kary Mullis však za ni roku 1983 získal Nobelovu cenu. Podstata metody tkví v exponenciální amplifikaci *in vitro* určitého úseku DNA ohraničeného dvěma primery pomocí DNA-polymerázy (od roku 1976 se používá termostabilní Taq polymeráza). Od

² Autor práce zpracovával zejména exony 1, 2, 6a a 6b, na zpracování ostatních exonů se podílel pouze v malé míře.

svého zavedení se metoda PCR dočkala mnoha modifikací a stala se běžným postupem snad ve všech laboratořích pracujících s DNA.

K první amplifikaci exonů genu SHOX byla použita klasická PCR. Každý exon je třeba amplifikovat zvlášť, pouze exony 4 a 5 lze brát jako jeden amplikon. Před zpracováváním DNA pacientů bylo třeba optimalizovat podmínky (pomocí teplotních gradientů, hořčíkových gradientů apod.) pro všechny reakce (pro optimalizované protokoly viz přílohu č.4). Přítomnost výsledného produktu byla ověřována pomocí elektroforézy na horizontálním gelu (2% agaróza).

4.2.2 Sekvenační reakce metodou asymetrické PCR s použitím ddNTP

Produkt výše uvedené reakce (kap. 4.2.1) byl použit k dalšímu zpracování metodou asymetrické PCR s využitím dideoxyribonukleotidů (ddNTP), což jsou modifikované nukleotidy, na něž již nelze napojit další nukleotid (na atomu uhlíku 3' v cukru není navázán atom kyslíku, přes který se napojuje další nukleotid), které jsou v malém množství přidány do reakční směsi. Tyto ddNTP jsou označeny čtyřmi různými fluorochromy podle toho, o kterou bázi (A, T, C, G) se jedná. V průběhu reakce dochází k tomu, že DNA-polymeráza po nasyntetizování určité části reakce naváže na vlákno jeden ddNTP, čímž se syntéza vlákna ukončí. Protože ddNTP je v reakční směsi relativně málo a DNA-polymeráza je začleňuje na náhodná místa, obsahuje reakční směs po proběhnutí určitého množství cyklů velké množství různě dlouhých vláken (začínajících od stejného místa určeného primerem). (pro protokol viz přílohu č.5)

4.2.3 Přechištění a sekvenace

Produkt asymetrické PCR (kap. 4.2.2) bylo třeba před vlastní sekvenací ještě přechistit (pro protokol viz přílohu č.6). Poté následovala vlastní sekvenace na sekvenátoru.³

V této fázi jsou vlákna DNA citlivě rozdělena podle délky kapilární elektroforézou a pomocí počítače jsou snímány signály fluorochromů z posledního nukleotidu. Podle toho, který signál je zaznamenán, poznáme bázi tohoto nukleotidu.

³ Se sekvenátorem pracovala ing. Věra Kobrdlová.

4.3 Real-time PCR

4.3.1 Charakteristika metody

Metoda real-time PCR je odvozena od klasické PCR a používá se ke kvantitativní analýze templátu v reálném čase. Krom složek klasické PCR využívá navíc krátké sondy nasedající na cílovou amplifikovanou sekvenci. Tyto sondy mají na jednom konci navázaný fluorochrom a na druhém „zhášec“, který fluorochrom utlumuje. V každém cyklu PCR nasedají na DNA vedle primerů i tyto sondy, které jsou následně DNA-polymerázou při syntetizování nového vlákna odbourány. Fluorochrom a „zhášec“ jsou tak uvolněny a fluorochrom se „rozsvítí“, tento signál je snímán a zaznamenán počítačem. Jak probíhá PCR a přibývají kopie cílové sekvence, zvyšuje se exponenciálně i množství „svítících“ fluorochromů – snímáním tak vzniká tzv. amplifikační křivka, s jejíž pomocí lze stanovit počáteční množství templátové DNA. Jinou možností, nespecifickou, je použití fluorescenčního interkalačního činidla, které se „rozsvěcuje“, zatímco se zapojuje do nově vznikajících řetězců DNA. Vzniká tak analogická křivka.

Pokud budeme zkoumat delecí určité sekvence, můžeme pomocí real-time PCR snadno odlišit vzorky od jedinců bez delecí (normální křivka), s heterozygotní delecí (křivka bude mít shodný tvar, ale bude v čase posunutá) a s homozygotní delecí (křivka nevznikne, fluorochrom se „nerozsvítí“).

Díky této metodě je možné snadno, rychle a prakticky vyšetřit vzorky velkého množství jedinců.

4.3.2 Použití metody real-time PCR

Metoda real-time PCR byla využita k porovnání výskytu delecí v oblastech asociovaných s genem SHOX (sonda L5101) u postižených pacientů a kontrolní skupinou – populačním vzorkem (pro protokol viz přílohu č.7). Použita byla souprava s interkalačním činidlem SYBR Green, podmínky reakce (koncentrace primerů apod.) bylo třeba nejdříve optimalizovat.

Protože vzorky DNA měly různou koncentraci, bylo nutné použít pro vnitřní kontrolu gen pro glyceraldehydfostátdehydrogenázu (GADPH). Porovnávány následně byly rozdíly v křivkách amplifikace vyšetřované oblasti a genu GADPH.

5. Výsledky a diskuse

5.1 Mikrodeleční syndromy

5.1.1 Souhrnné výsledky

Vyšetřeno bylo 50 indikovaných probandů (z toho 28 pohlaví ženského, 22 mužského) metodou MLPA (viz příloha č.8). U 8 probandů (z toho 4 pohlaví mužského, 4 ženského), což znamená přibližně 16 %, byl zaznamenán pozitivní nález :

proband 4A : del 1p36.33 (syndrom monosomie 1p36)

proband 6A : dup X/Yp

proband 20A : del 7q11.23 (Williamsův syndrom)

proband 21A : dup 22q11

proband 22A : del 17p13.3 (Miller-Diekerův syndrom)

proband 35A : del 15q11.2-q12 (Prader-Williho syndrom)

proband 44A : del 17p11.2 (Smith-Magenisův syndrom)

proband 49A : del 10p

Množství pozitivních nálezů odpovídá očekávání a je ve shodě s publikovanými studiemi (srov. de Vries et al., 1997; de Vries et al., 2003; Rauch et al., 2006).

5.1.2 Charakteristika probandů s pozitivním nálezem

Pro kontrolní vzhled MLPA u negativních vzorků viz kap. 5.1.2.9.

5.1.2.1 Proband 4A

rok narození : 2004

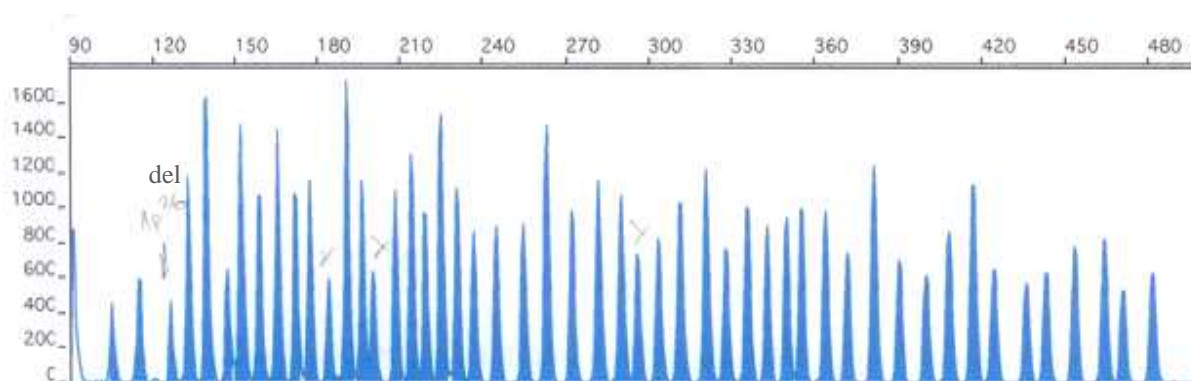
pohlaví : muž

klinické projevy : psychomotorická retardace, epilepsie, hypotonie, kraniofaciální dysmorfie (brachycefalická hlava, bilaterální epikantus, širší kořen a špička nosu, špičatá brada, nízko posazené uši)

molekulární nález : U probanda 4A byla pomocí metody MLPA (kit P245) detekována delece v místě jedné ze tří sond vyšetřujících oblast 1p36. Snížený signál byl zaznamenán u nejvíce distální sondy lokalizované do regionu 1p36.33. Minimální rozsah delece je 1130-1138 kb od konce p raménka chromozómu 1. V oblasti minimálně 1,76 Mb a více od konce p raménka chromozómu 1 delece detekována nebyla.

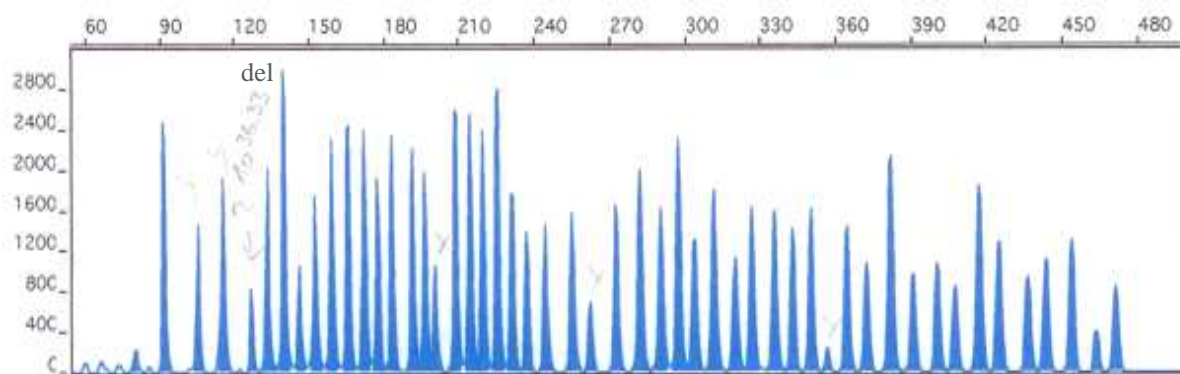
Analýza ostatních vyšetřovaných oblastí byla negativní.

Tento nález byl ověřen použitím kitu P036.



Obrázek 7

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P245) probanda 4A



Obrázek 8

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P036) probanda 4A

vyšetření rodiny : Oba rodiče mají negativní nález.

diskuse : Proband 4A vykazuje fenotypové znaky typické pro syndrom parciální monosomie 1p36 (mentální a růstová retardace, typický facies, epilepsie), některé typické znaky – zejm. poruchy sluchu (cca 56 % pacientů) či zraku, nebo tendence k sebepoškozování (cca 55 % pacientů) – se však neprojevují (srov. Gajecka et al., 2007). To potvrzuje teorii, že za převážnou část fenotypu jsou zodpovědné geny v nejdistančnější části kritické oblasti (srov. Wu et al., 1999; Zenker et al., 2002), avšak za poruchy sluchu a zraku a poruchy chování jsou pravděpodobně zodpovědné geny lokalizované proximálněji.

Delece zasahuje oblast minimálně 1130-1138 kb a maximálně 1,76 Mb od konce p rámenka. Zajímavé je, že nezasahuje gen GABRD (GABA receptor delta-subunit gene), jenž je zkoumán jako možný původce psychomotorické retardace a epilepsie, kteréžto proband oboje vykazuje (srov. Windpassinger et al., 2002). Je tedy pravděpodobné, že tyto projevy mohou být spojeny s postižením ještě dalšího distálněji situovaného genu.

Vzhledem k negativnímu nálezu u rodičů je možné, že u probanda došlo k mutaci *de novo*. Nemůžeme však vyloučit balancovanou translokaci u některého z rodičů, kterou metoda MLPA nedokáže odhalit. Delece způsobující monosomii 1p36 mívají velmi variabilní rozsah, od asi 1,5 Mb až po více než 10,5 Mb (Heilstedt et al., 2003), delece probanda 4A tedy patří k nejkratším známým delecím.

5.1.2.2 Proband 6A

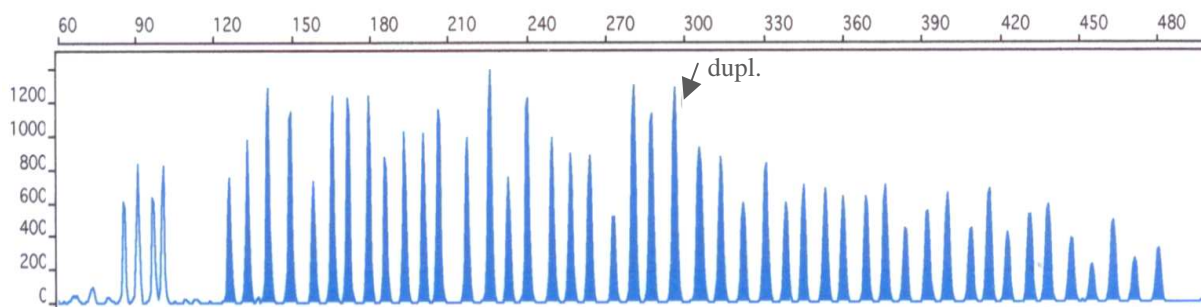
rok narození : 2005

pohlaví : žena

klinické projevy : psychomotorická retardace, retardace růstu, makrocefalie, faciální dysmorfie (vypuklé a nápadně vysoké čelo, vpáčený kořen nosu, krátké filtrum, malá brada)

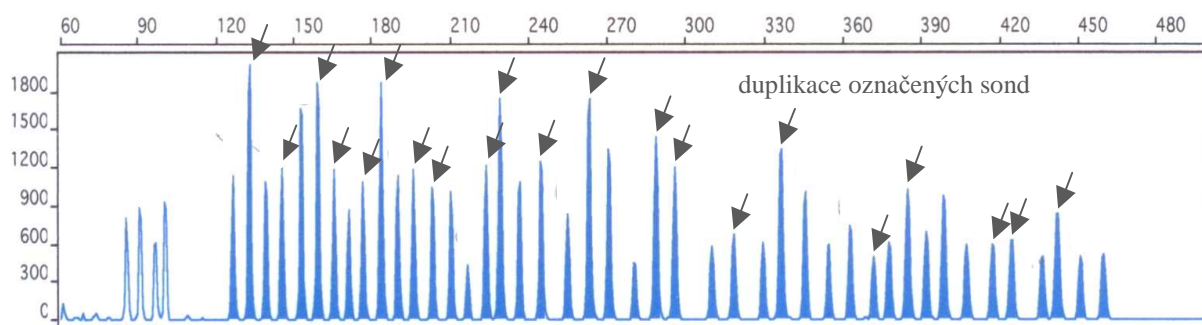
molekulární nález : Vyšetření probandky 5A pomocí metody MLPA (kit P245) přineslo negativní nález. Při následném vyšetření prostřednictvím kitu P036 byla detekována duplikace subtelomerické oblasti X/Yp. Analýza ostatních vyšetřovaných oblastí byla negativní.

Použitím kitu P018 byla potvrzena intersticiální duplikace v oblasti PAR1 zahrnující gen SHOX a jeho regulační oblasti. Telomerické ani X-specifické sekvence nejsou zasaženy.



Obrázek 9

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P036) probanda 5A



Obrázek 10

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probanda 5A

vyšetření rodiny : Oba rodiče a starší sestra jsou zdraví, molekulárně genetické vyšetření bylo doporučeno, nebylo však dosud provedeno.

diskuse : Molekulární nález u probandky 6A patří k dosti vzácným přestavbám a je spojován s velmi variabilním fenotypem (srov. Miozzo et al., 2010; Thomas et al., 2009). Ani v jednom ze srovnávaných případů však není duplikace spojena s mentální retardací, ale s variabilně sníženým vzrůstem, Madelungovou deformitou nebo rozštěpem patra. Popřípadě osoba s duplikací nevykazuje žádné klinické abnormality.

Nelze tedy s jistotou říci, zda jsou klinické projevy probandky 6A důsledkem této přestavby. Mohla by být případně zodpovědná za část fenotypu – některé projevy (např. retardace růstu) se shodují se známými případy, jiné (např. psychomotorická retardace) se naopak neshodují. Další informace by mělo dodat vyšetření blízkých příbuzných probandky a srovnání s dalšími publikovanými pracemi, které se v budoucnu objeví.

Dle lékařské zprávy bylo u probandky původně prověřováno podezření na achondroplázii a hypochondroplázii, která byla vyvrácena. Sekundární dysmorfie by také mohly být důsledkem primární makrocefalie.

5.1.2.3 Proband 20A

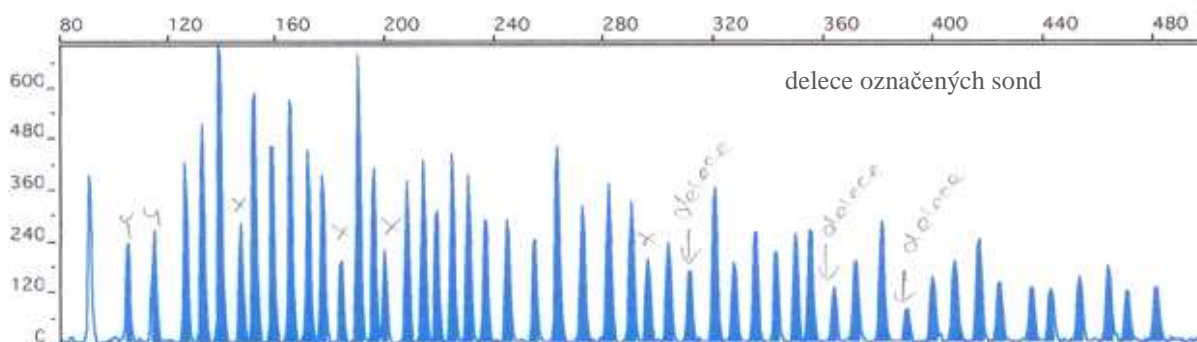
rok narození : 2005

pohlaví : muž

klinické projevy : supraaortální stenóza plicnice a aorty, psychomotorická retardace, hypertyreóza, poruchy funkce trávicího traktu, osteogenesis imperfecta

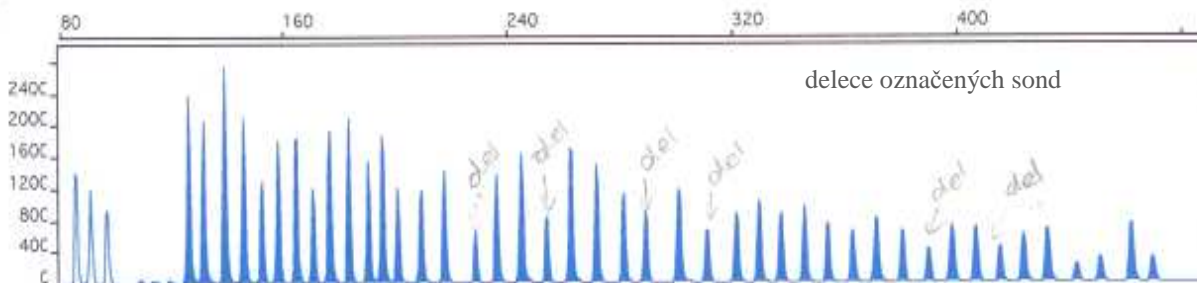
molekulární nález : U probanda 20A byla pomocí metody MLPA (kit P245) detekována delece v místě všech tří sond vyšetřujících oblast 7q11.23. Tato delece je asociována s Williamsovým syndromem. Analýza ostatních vyšetřovaných oblastí byla negativní.

Tento nález byl ověřen použitím kitu P064.



Obrázek 11

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P245) probanda 20A



Obrázek 12

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P064) probanda 20A

vyšetření rodiny : Matka trpí osteogenesis imperfecta. Otec a starší syn jsou zdraví. Před narozením prvního dítěte prodělala matka jeden spontánní a jeden indukovaný potrat.

diskuse : U probanda 20A se projevují dvě genetická postižení. Po matce zdědil autosomálně dominantní onemocnění osteogenesis imperfecta (geneticky heterogenní asociované zejména s lokusy 17q21.31. a 7q22.1) s obvyklým fenotypickým projevem.

Ostatní klinické projevy odpovídají typickým symptomům Williamsova syndromu (srov. Cherniske et al., 2004). Delece všech tří sond poukazuje na delecí velkého rozsahu, která pravděpodobně zasahuje většinu kritického regionu o velikosti asi 1,6 Mb (DeSilva et al., 2002). To naznačují i poruchy psychického vývoje, jejichž původ je asociován spíše s oblastmi dále od středu kritického regionu (zatímco ve středu je lokalizován gen pro elastin ELN, jehož delece je spojována zejména s postižením cév) (srov. Doyle et al., 2004). Je však nutné provést další vyšetření pro přesnou lokalizaci a stanovení rozsahu delece.

Vzhledem k tomu, že obě onemocnění mají na chromozómu 7 různou lokalizaci, jeví se jejich koincidence jako náhodná.

5.1.2.4 Proband 21A

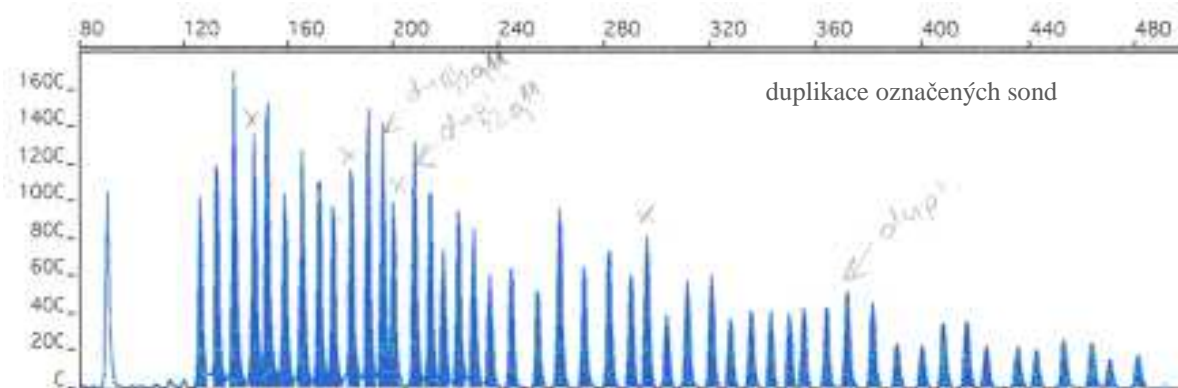
rok narození : 1997

pohlaví : žena

klinické projevy : mentální vývoj těsně nad hranicí mentální retardace, vývojová porucha učení, disharmonický emocionální vývoj, mírný paleocerebrální syndrom, mírná kraniofaciální dysmorfie (vysoké rovné čelo, antimongoloidní průběh očních štěrbin, oční víčka v lehké ptóze, nízko posazené uši)

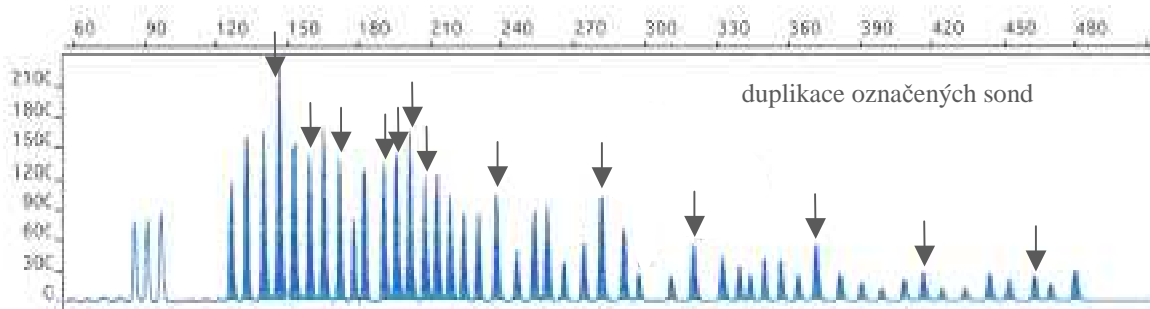
molekulární nález : U probandky 21A byla pomocí metody MLPA (kit P245) detekována duplikace v místě všech tří sond vyšetřujících oblast 22q11.21. Analýza ostatních vyšetřovaných oblastí byla negativní.

Použitím kitu P250 byla potvrzena duplikace oblasti 22q11 mezi LCR bloky A-D.



Obrázek 13

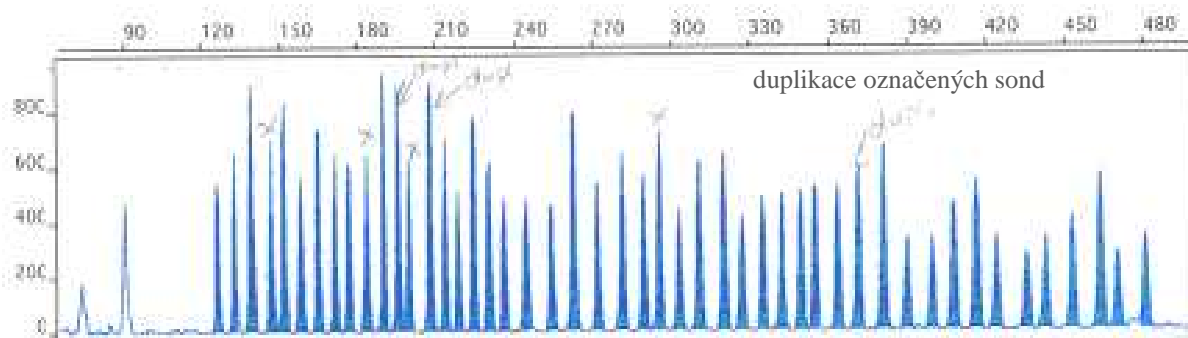
Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P245) probandky 21A



Obrázek 14

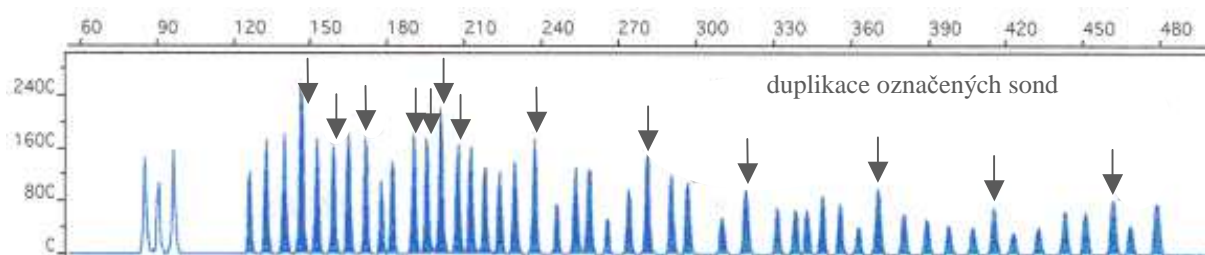
Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P250) probandky 21A

vyšetření rodiny : Otec i matka probandky 21A byli vyšetřeni kity P245 a P250. Nález otce byl negativní. U matky byla detekována shodná duplikace v oblasti 22q11 jako u probandky. Na rozdíl od probandky se však u matky neprojevují žádné klinické příznaky. Byla doporučena vyšetření dalších členů rodiny, zejména z matčiny strany.



Obrázek 15

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P245) matky probandky 21A



Obrázek 16

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P250) matky probandky 21A

diskuse : Duplikace v oblasti 22q11.21 jsou asociovány s velmi variabilním fenotypem – od žádných klinických projevů až po těžká postižení podobná DiGeorgovu syndromu – a to dokonce i v rámci jedné rodiny (Yu et al., 2008). V některých případech je spojována s tzv. syndromem Cat-eye (Portnoi et al., 2005). Variabilita může být vysvětlena vlivem dalších (neznámých) genů nebo epigenetických faktorů na stupeň penetrance. Ovšem duplikace by mohly také být jen benigním polymorfismem, příčinu patologických projevů by pak bylo nutné hledat zcela jinde.

Nelze tedy s jistotou říci, zda nalezená duplikace zodpovídá za klinický profil probandky 21A. Osvětlení role duplikací oblasti 22q11.21 pravděpodobně přinese až vyšetření dalších postižených rodin, srovnávání publikovaných případů a výzkum funkce zasažených genů.

5.1.2.5 Proband 22A

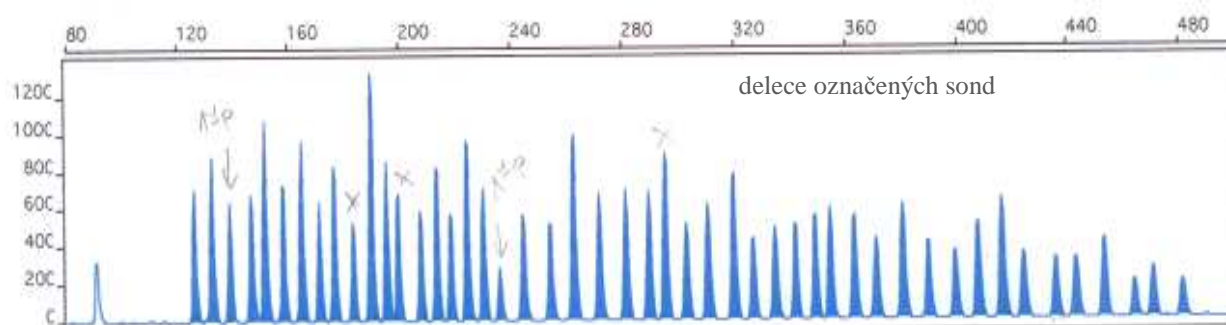
rok narození : 2007

pohlaví : žena

klinické projevy : lisencefalie typu 1 (agyrie), mikrocefalie, epilepsie, retardace motorického vývoje

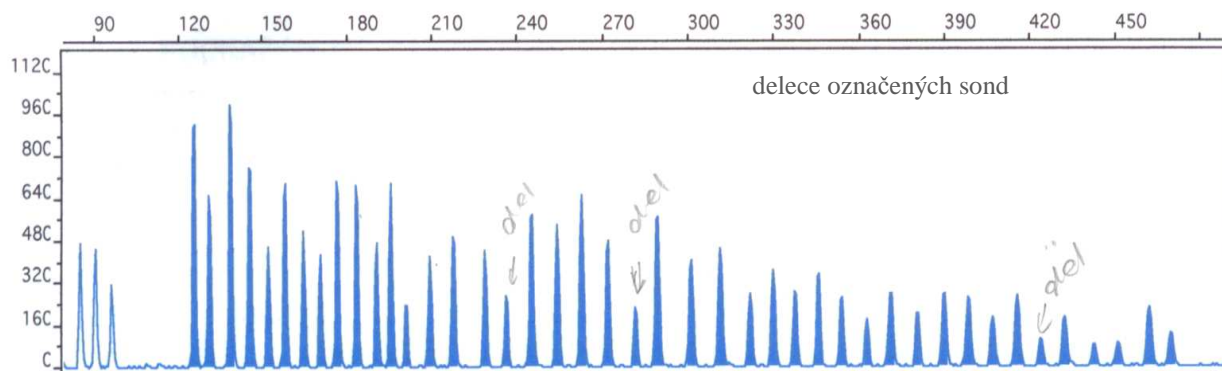
molekulární nález : U probandky 22A byla pomocí metody MLPA (kit P245) detekována delece v místě obou dvou sond vyšetřujících oblast 17p13.3. Tato delece je asociována s Miller-Diekerovým syndromem. Analýza ostatních vyšetřovaných oblastí byla negativní.

Tento nález byl ověřen použitím kitu P064.



Obrázek 17

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P245) probandky 22A



Obrázek 18

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P064) probandky 22A

vyšetření rodiny : Genealogickým vyšetřením nebyl nalezen případ mentální retardace ani jiné výrazné vývojové anomalie. Molekulárně genetické vyšetření rodičů nebylo provedeno.

diskuse : Probandka 22A vykazuje typické znaky Miller-Diekerova syndromu, tedy zejména lisencefalii nejtěžšího stupně (mozek má zesílený a vyhlazený kortex) a mikrocefalii (srov. Dobyns et al., 1991). Pro přesnou lokalizaci a zjištění rozsahu delece je třeba provést další vyšetření. Vzhledem k rodinné anamnéze se jeví, že mutace vznikla *de novo*.

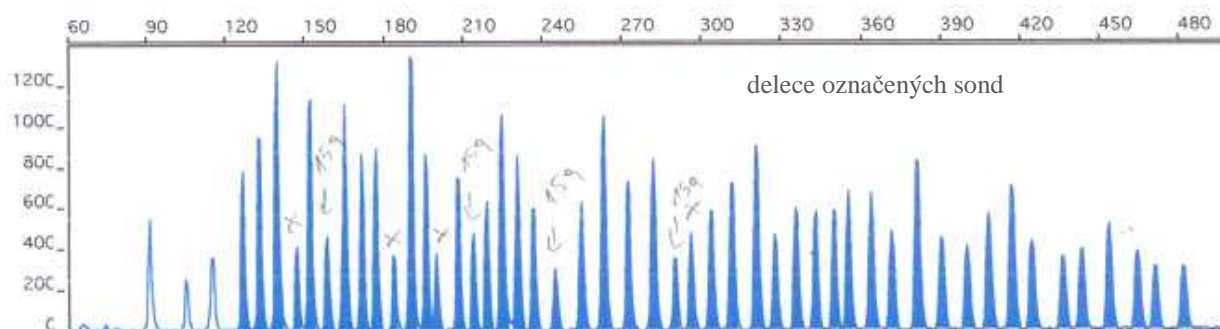
5.1.2.6 Proband 35A

rok narození : 2008

pohlaví : muž

klinické projevy : hypotonie, slabý mňoukavý pláč, apatie, malá spontánní aktivita, dolichocefalická hlava, faciální dysmorfie (úzká tvář, úzké čelo, šikmé oční štěrby, poklesnuté koutky úst,), hypotrofie, kryptorchismus

molekulární nález : U probanda 35A byla pomocí metody MLPA (kit P245) detekována delece v místě všech čtyř sond vyšetřujících oblast 15q11.2-q12. Tato delece je asociována s Prader-Williho/Angelmanovým syndromem. Analýza ostatních vyšetřovaných oblastí byla negativní.



Obrázek 19

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P245) probanda 35A

vyšetření rodiny : Oba rodiče jsou zdraví, molekulárně genetické vyšetření nebylo provedeno.

diskuse : Proband 35A vykazuje typické fenotypové znaky Prader-Williho syndromu (hypotonie, nízká aktivita, typický facies, hypogonadismus) (srov. Papavramidis et al., 2006). Další projevy jako hyperfagie či poruchy chování se pravděpodobně projeví až v odpovídajícím věku.

Syndrom je způsobem mikroleceí, k čemuž dochází asi u 70 % pacientů (Cassidy et al., 2000). Vzhledem k delecí všech čtyř sond lze usuzovat na delecí celého regionu o velikosti asi 4 Mb, která se vyskytuje u velké většiny pacientů (Christian et al., 1995). To bude ověřeno podrobnějším vyšetřením rozsahu delecí. Vzhledem k tomu, že rodiče jsou zdraví můžeme předpokládat, že mutace vznikla *de novo*. Pro potvrzení diagnózy bude nutné také ověřit stupeň methylace CpG ostrůvků genu SNRPN.

5.1.2.7 Proband 44A

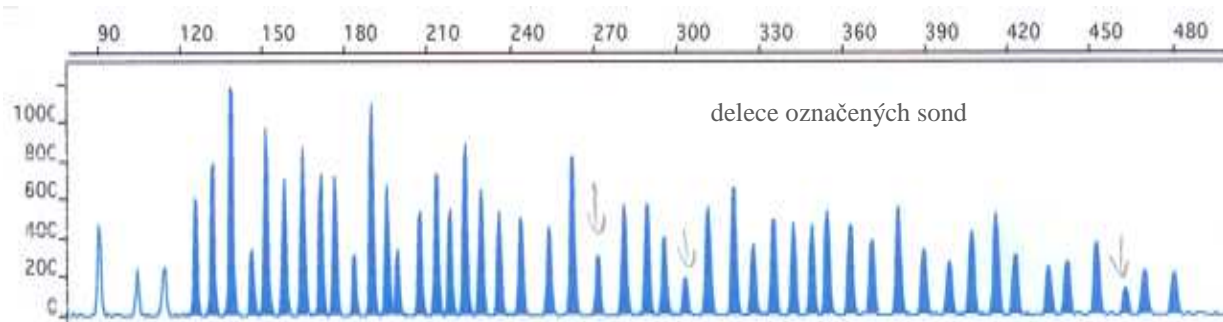
rok narození : 2002

pohlaví : muž

klinické projevy : lehká mentální retardace, kraniofaciální dysmorfie (brachycefalie, mikrocefalie, oploštěný obličej, malý nos, nízko posazené uši, mandlovité oči, řídké zuby), opožděný rozvoj řeči, poruchy spánku, stereotypní pohyby, občas mírné sebepoškozování, hypotonie, epilepsie,

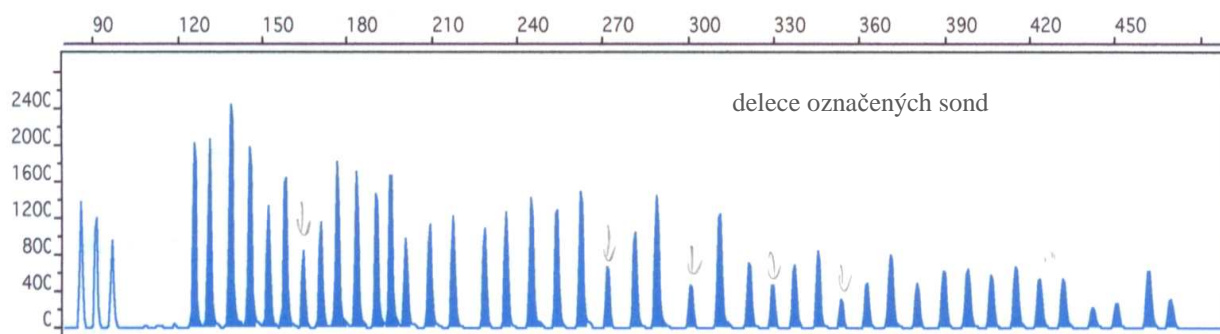
molekulární nález : U probanda 44A byla pomocí metody MLPA (kit P245) detekována delece v místě všech tří sond vyšetřujících oblast 17p11.2. Tato delece je asociována se Smith-Magenisovým syndromem. Analýza ostatních vyšetřovaných oblastí byla negativní.

Tento nález byl ověřen použitím kitu P064.



Obrázek 20

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P245) probanda 44A



Obrázek 21

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P064) probanda 44A

vyšetření rodiny : Oba rodiče jsou zdraví, jejich molekulárně genetické vyšetření bylo doporučeno, avšak dosud nebylo provedeno.

diskuse : Proband 44A vykazuje typické projevy Smith-Magenisova syndromu, tedy mentální retardaci, typický facies, poruchy spánku či agresivní chování se sklony k sebepoškozování (srov. Lockwood et al., 1988). Velikost delece může být značně variabilní (od 1,5 Mb až po 9 Mb), avšak asi 76 % pacientů má velmi podobnou deleci o velikosti asi 3,5 Mb vymezenou dlouhými bloky LCR (srov. Gropman et al., 2007; Potocki et al., 2003; Trask et al., 1996 in Vlangos et al., 2003). Zda má proband také tuto variantu delece, bude zjištěno až podrobným vyšetřením. Mutace pravděpodobně vznikla *de novo*.

5.1.2.8 Proband 49A

rok narození : 2000

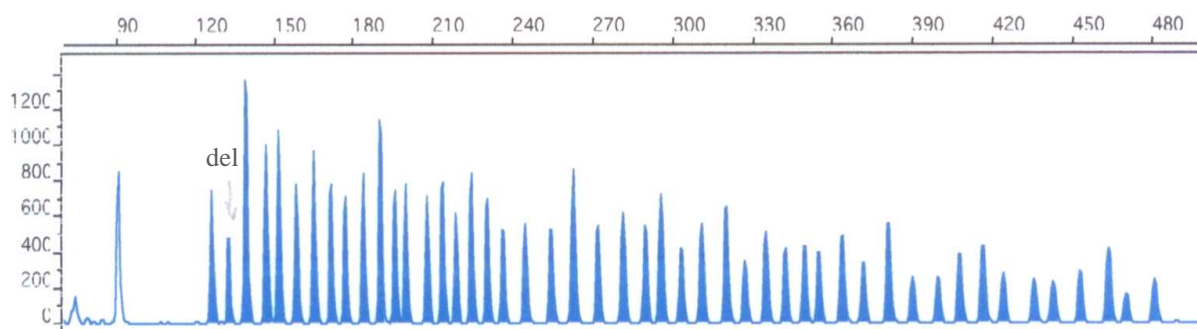
pohlaví : žena

klinické projevy : opožděný vývoj, progradující mikrocefalie, faciální dysmorfie (vypouklé čelo, malé odstávající dysplastické ušní boltce, krátké oční štěrby, zapadlé oči, mírná retrognatie), porucha sluchu, postižení ledvin, na horních končetinách kožní syndaktylie mezi 3. a 4. prstem, na dolních končetinách úplná kožní syndaktylie mezi 2. a 3. prstem

molekulární nález : U probandky 49A byla pomocí metody MLPA (kit P245) detekována delece v místě jedné sondy vyšetřující oblast 10p15, sonda lokalizuje do 1. exonu genu GATA3. Analýza ostatních vyšetřovaných oblastí byla negativní.

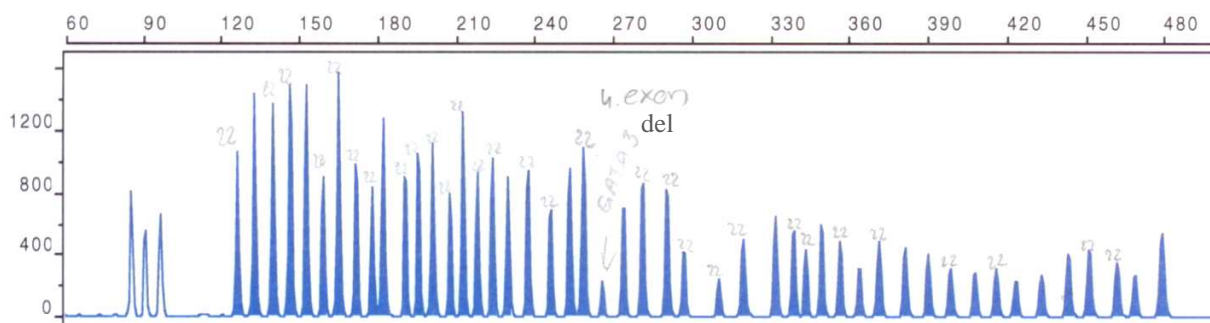
Použitím kitu P250 byla delece potvrzena, deletovaná sonda lokalizuje do 4. exonu genu GATA3.

Vzhledem k umístění sond lze usuzovat, že delece zasahuje celý gen GATA3.



Obrázek 22

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P245) probandky 49A



Obrázek 23

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P250) probandky 49A

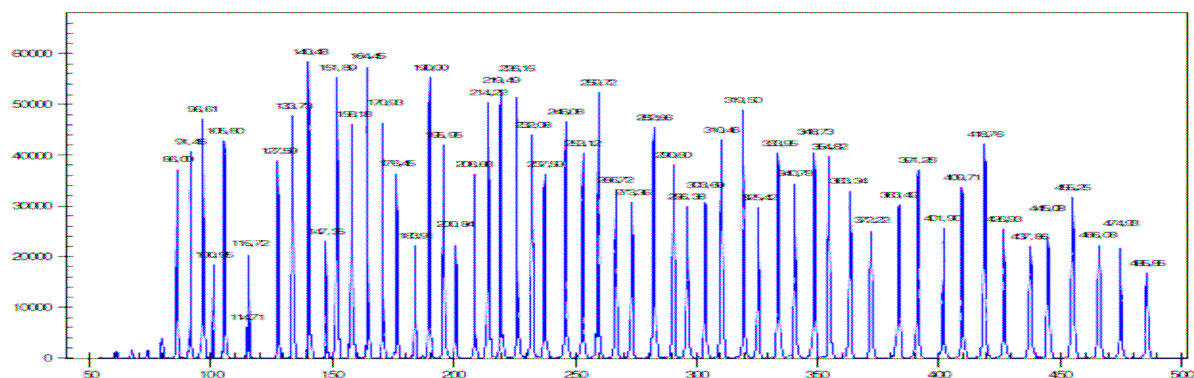
vyšetření rodiny : Oba rodiče jsou zdraví, molekulárně genetické vyšetření nebylo provedeno.

diskuse : Delece oblasti 10p12-p15 bývá asociována s DiGeorgovým syndromem II, patologie genu GATA3 v oblasti 10p15 pak sama se syndromem HDR (hypoparathyroidismus, sensorineurální hluchota, renální abnormality). Fenotypové znaky probandky 49A je možné přiřadit k oběma těmto syndromům (srov. Berend et al., 2000). Přesnější určení bude možné až po podrobnějším vyšetření rozsahu a lokalizace delece a identifikaci zasažených genů.

Do typického fenotypu těchto syndromů však nezapadá syndaktylie. Ta však může být podmíněná monogenně, např. autosomálně dominantně dědičná syndaktylie typu I, nezávisle na mikrolečním syndromu. Pokud by se jednalo o výše uvedený nejčastější typ syndaktylie, jednalo by se vzhledem k negativnímu nálezu u rodičů nejspíše o mutaci *de novo*.

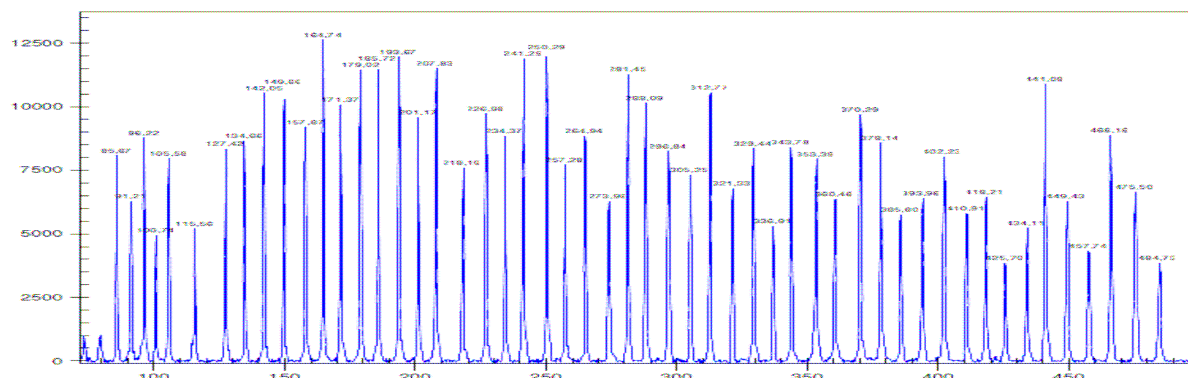
5.1.2.9 Negativní kontroly

Vzhled MLPA s cca 50 ng DNA u negativních kontrol (převzato od MRC-Holland).



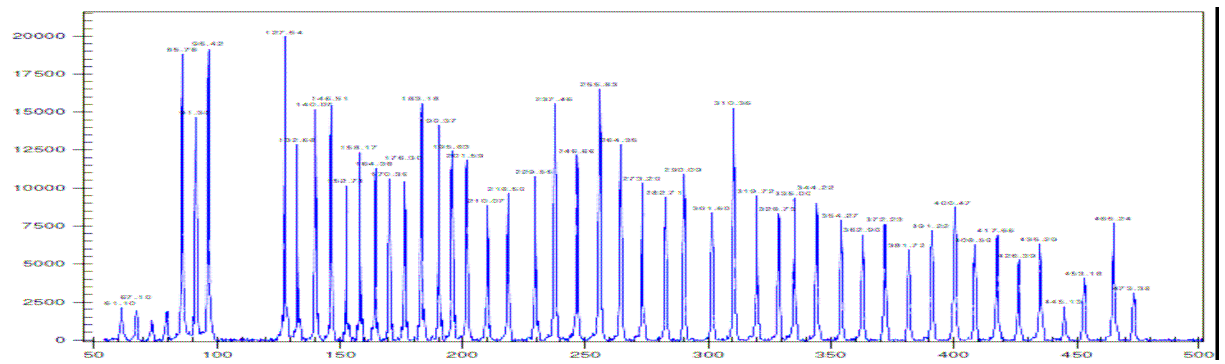
Obrázek 24

Výsledek vyšetření SALSA MLPA kit P245 (muž)



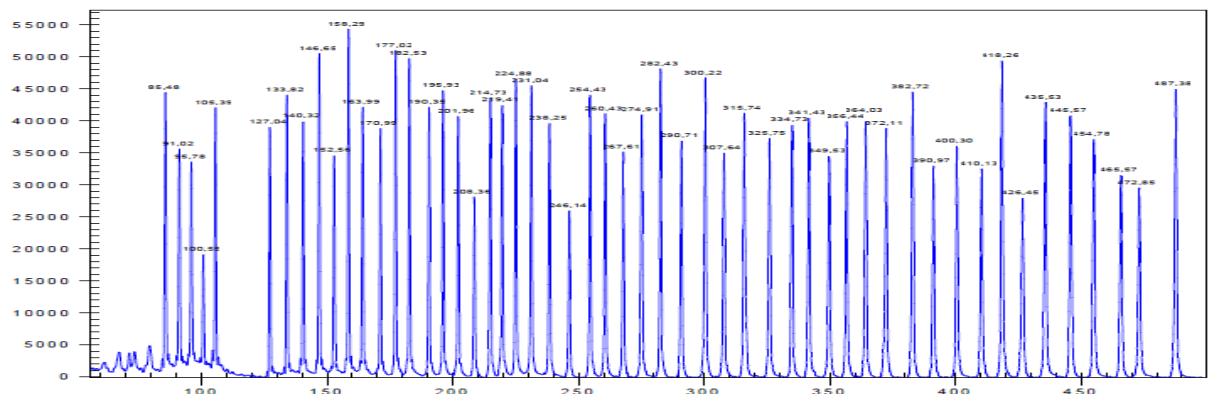
Obrázek 25

Výsledek vyšetření SALSA MLPA kit P036



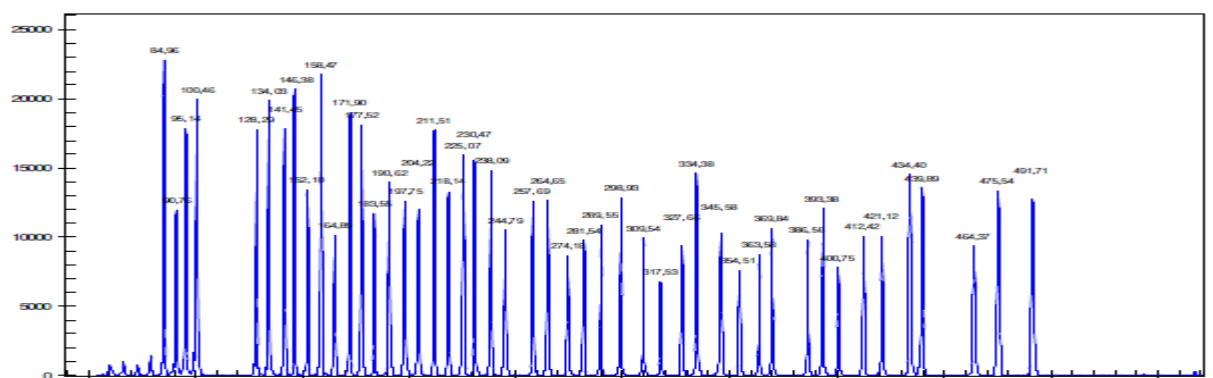
Obrázek 26

Výsledek vyšetření SALSA MLPA kit P064



Obrázek 27

Výsledek vyšetření SALSA MLPA kit P250



Obrázek 28

Výsledek vyšetření SALSA MLPA kit P018 (žena)

5.1.3 Shrnutí

Vyšetřeno bylo 50 indikovaných probandů (z toho 28 pohlaví ženského, 22 mužského) metodou MLPA. U 8 probandů (z toho 4 pohlaví mužského, 4 ženského), což znamená přibližně 16 %, byl zaznamenán pozitivní nález. Množství pozitivních nálezů odpovídá očekávání a je ve shodě s publikovanými studiemi (srov. de Vries et al., 1997; de Vries et al., 2003; Rauch et al., 2006).

Proband 20A (del 7q11.23 – Williamsův syndrom), probandka 22A (del 17p13.3 – Miller-Diekerův syndrom), proband 35A (del 15q11.2-q12 – Prader-Williho syndrom) a proband 44A (del 17p11.2 – Smith-Magenisův syndrom) vykazují typické fenotypické projevy odpovídajících syndromů (pouze proband 20A trpí navíc osteogenesis imperfecta). Delece zasahují vždy celou vyšetřovanou oblast a vznikly pravděpodobně *de novo*.

U probanda 4A byla nalezena malá delece v distální oblasti kritického regionu pro syndrom monosomie 1p36. Přes malý rozsah delece proband vykazuje většinu typických projevů monosomie 1p36. Podrobnější vyšetření tak může přispět k určení podezřelých lokusů spojených s některými projevy.

Probandka 49A vykazuje fenotypické projevy, které odpovídají DiGeorgovu syndromu II i syndromu HDR, což odpovídá detekované deleci v oblasti 10p15 zahrnující gen GATA3. Je nutné provést podrobnější vyšetření. Klinickému profilu neodpovídá pouze syndaktylie na horních i dolních končetinách.

Molekulárně genetické nálezy probandky 6A (dup X/Yp) a probandky 21A (dup 22q11) jsou spojovány s velmi variabilním fenotypem a jejich kauzální spojení s patologickým fenotypem nelze potvrdit.

Metoda MLPA se při vyšetření ukázala jako účinná a efektivní. Nejmenší zachycená delece má velikost asi 1,13 – 1,76 Mb, což prokazuje vysokou rozlišovací schopnost této metody, přestože tato schopnost může být ještě větší (srov. Rooms et al., 2006).

V rámci dalšího výzkumu bychom se rádi zaměřili na přesnou lokalizaci a popis delecí, aplikovali metodu CGH a porovnali její výsledky s MLPA a dokončili vyšetření rodinných příslušníků. Budeme také průběžně rozšiřovat soubor probandů o nově vyšetřené případy.⁴

⁴ Výsledky tohoto výzkumu by měly být součástí autorovy disertační práce.

5.2 Patologie genu SHOX

5.2.1 Souhrnné výsledky

Vyšetřeno bylo 40 indikovaných probandů (z toho 29 pohlaví ženského, 11 mužského) metodou MLPA (viz příloha č.9). Z toho 11 probandům (27,5 %; 10 žen, 1 muž) byla diagnostikována dyschondrosteóza (DYS) a 29 probandům (72,5 %; 19 žen, 10 mužů) idiopatický malý vzrůst (idiopathic short stature, ISS).

U 6 probandů (15 %; 5 s DYS, 1 s ISS) byla nalezena delece v genu SHOX. U dvou pacientů (5 %; oba s DYS) byla detekována delece regulačních oblastí genu SHOX. U dvou pacientů (5 %; 1 s DYS, 1 s ISS) byla nalezena duplikace v oblasti PAR1 (mimo gen SHOX, potenciální regulační oblasti genu SHOX).

Z 11 probandů s diagnostikovanou DYS byla tedy u 5 z nich (45,5 %) nalezena delece genu SHOX, u 2 z nich (18,2 %) byla detekována delece v prokázaných regulačních oblastech – souhrnem u 7 probandů s DYS (63,6 %) byla prokázána delece související s genem SHOX. U 1 probanda (9,1 %) byla nalezena duplikace v regionu PAR1 – celkem u 8 probandů s DYS (72,7 %) byla nalezena kryptická přestavba. U 3 probandů s DYS (27,3 %) nebyla nalezena žádná přestavba. U 1 probanda s delecí v genu SHOX byla detekována i delece sondy L5101.

Z 29 probandů s diagnostikovanou ISS byla u 1 probanda (3,4 %) nalezena delece genu SHOX a u 1 probanda (3,4 %) duplikace v regionu PAR1 a zároveň i delece v oblasti vyšetřované sondou L5101. U 7 probandů (24,1 %) byla detekována izolovaná delece oblasti vyšetřované sondou L5101. Celkem u 9 probandů s ISS (31 %) byla nalezena kryptická přestavba.

Podíl probandů s diagnostikovanou DYS, u kterých byla nalezena delece prokazatelně spojená s genem SHOX, tj. 63,6 %, je o málo menší, než lze předpokládat dle publikovaných studií, které běžně udávají podíl větší než 70 % (srov. Hintz, 2002; Kosho et al., 1999; Ogata et al., 2002). Roli v tomto ovšem může hrát relativně nízký počet probandů (1 proband = 9,1 %) a nezahrnutí kauzálních bodových mutací. Údaje budou průkaznější až po rozšíření vyšetřovaného souboru probandů, sekvenaci (viz kap. 5.2.3) a porovnání nalezených bodových mutací s populační studií.

U probandů s ISS byl jeden nález delece genu SHOX očekávatelný (srov. Rappold et al., 2002).

5.2.2 Charakteristika probandů s pozitivním nálezem

Pro kontrolní vzhled MLPA u negativních vzorků viz kap. 5.2.2.18.

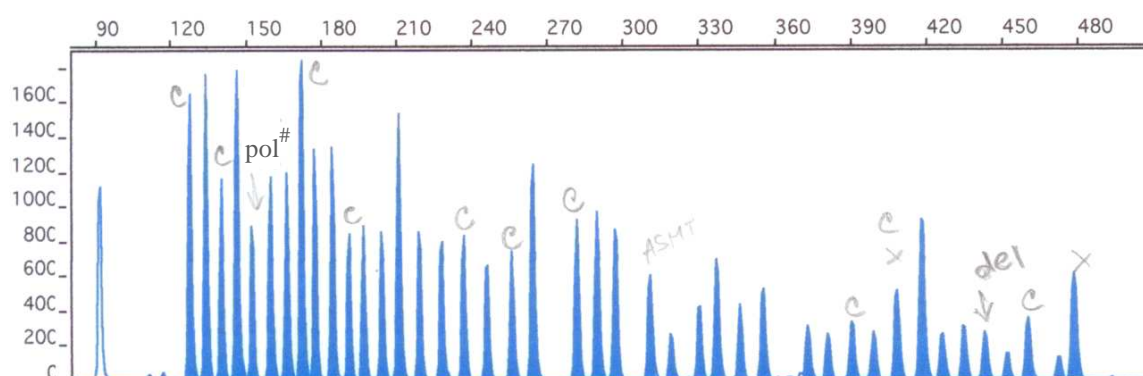
5.2.2.1 Proband 1B

rok narození : 1991

pohlaví : žena

diagnóza : idiopatický malý vzrůst

molekulární nález : U probandky 1B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována delece v oblasti vyšetřované sondou L5101.



Obrázek 29

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probandky 1B
(pol#... pokles sondy způsoben polymorfizmem pod sondou)

diskuse : U probandky 1B byla detekována delece v PAR1, v oblasti vyšetřované sondou L5101, která by potenciálně mohla zasahovat i regulační elementy genu SHOX, jejichž delece může způsobovat shodná nebo obdobná postižení jako delece kódujících sekvencí genu SHOX (srov. Benito-Sanz et al., 2006). Delece v této konkrétní oblasti však byla pozorována i u zdravých jedinců (srov. Chen et al., 2009).

V tuto chvíli nedokážeme posoudit, zda se jedná o kauzální deleci, predispozici nebo pouze o populační variantu (viz kap. 5.2.4).

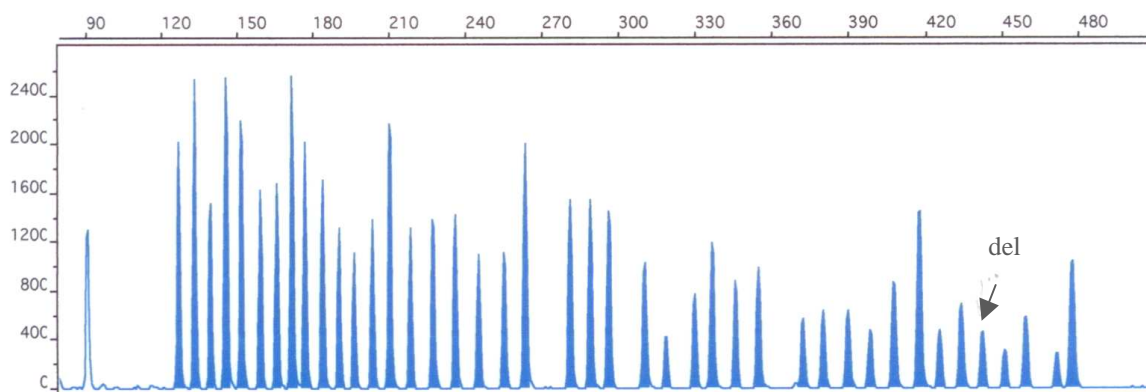
5.2.2.2 Proband 2B

rok narození : 2004

pohlaví : muž

diagnóza : idiopatický malý vzrůst

molekulární nález : U probanda 2B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována delece v oblasti vyšetřované sondou L5101.



Obrázek 30

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probanda 2B

diskuse : U probanda 2B byla detekována delece v PAR1, v oblasti vyšetřované sondou L5101, která by potenciálně mohla zasahovat i regulační elementy genu SHOX, jejichž delece může způsobovat shodná nebo obdobná postižení jako delece kódujících sekvencí genu SHOX (srov. Benito-Sanz et al., 2006). Delece v této konkrétní oblasti však byla pozorována i u zdravých jedinců (srov. Chen et al., 2009).

V tuto chvíli nedokážeme posoudit, zda se jedná o kauzální delecii, predispozici nebo pouze o populační variantu (viz kap. 5.2.4).

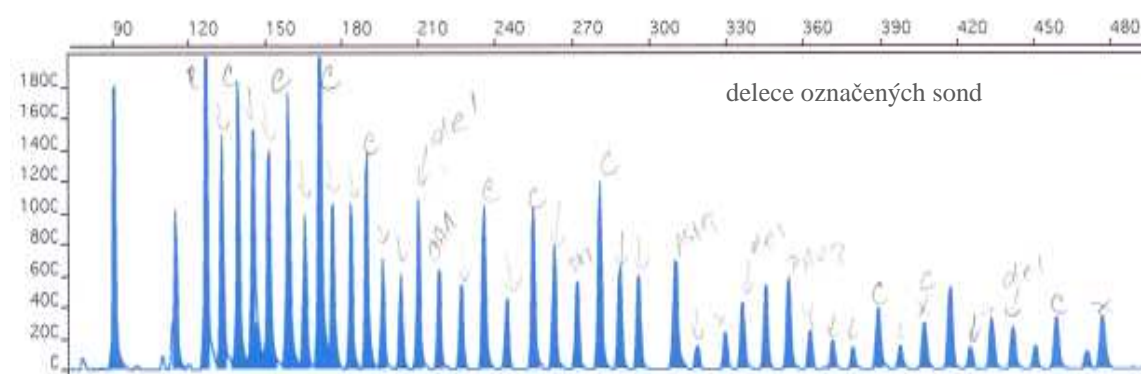
5.2.2.3 Proband 6B

rok narození : 1994

pohlaví : muž

diagnóza : idiopatický malý vzrůst

molekulární nález : U probanda 6B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována intersticiální delece v oblasti PAR1 zahrnující gen SHOX a část přilehlých sekvencí. Centromerické místo zlomu se nalézá ve vzdálenosti 382,8 kb až 753,8 kb od 3' konce genu SHOX. Delece nezahrnuje vlastní telomerické sekvence ani X-specifické oblasti chromozómu.



Obrázek 31

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probanda 6B

diskuse : Delece genu SHOX může být prokázanou kauzální příčinou malého vzrůstu. Jelikož proband 6B vykazuje deleci zahrnující celý gen, lze ji považovat za původce jeho postižení.

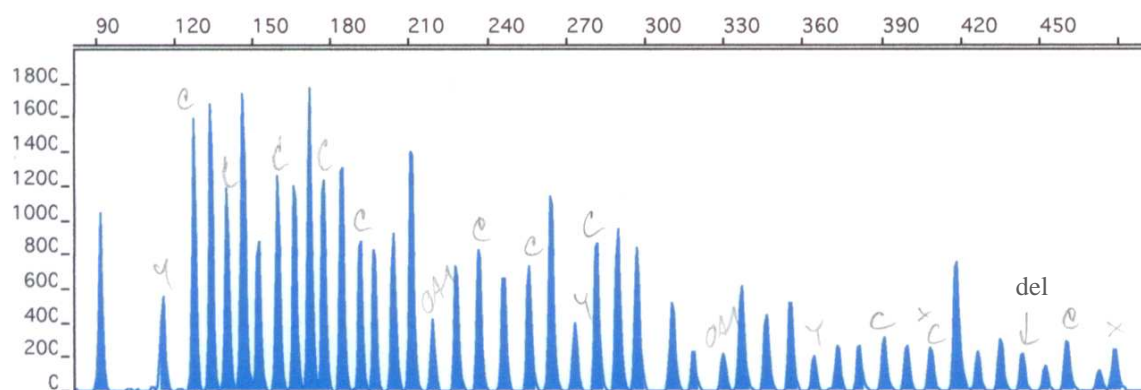
5.2.2.4 Proband 8B

rok narození : 1993

pohlaví : muž

diagnóza : idiopatický malý vzrůst

molekulární nález : U probanda 8B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována delece v oblasti vyšetřované sondou L5101.



Obrázek 32

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probanda 8B

diskuse : U probanda 8B byla detekována delece v PAR1, v oblasti vyšetřované sondou L5101, která by potenciálně mohla zasahovat i regulační elementy genu SHOX, jejichž delece může způsobovat shodná nebo obdobná postižení jako delece kódujících sekvencí genu SHOX (srov. Benito-Sanz et al., 2006). Delece v této konkrétní oblasti však byla pozorována i u zdravých jedinců (srov. Chen et al., 2009).

V tuto chvíli nedokážeme posoudit, zda se jedná o kauzální deleci, predispozici nebo pouze o populační variantu (viz kap. 5.2.4).

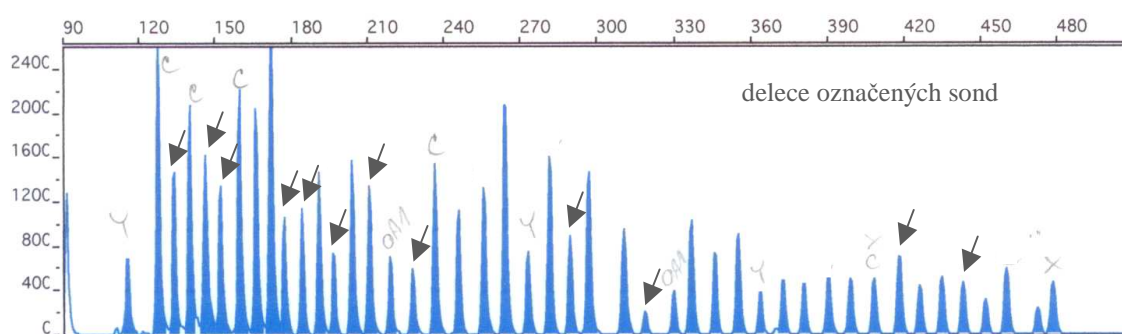
5.2.2.5 Proband 10B

rok narození : 1964

pohlaví : muž

diagnóza : dyschondrosteóza

molekulární nález : U probanda 10B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována rozsáhlá delece nezasahující kódující oblast genu SHOX, ale postihuje proximálně přilehlé sekvence zahrnující regulační oblasti genu SHOX. Delece nezasahuje X-specifické oblasti chromozómu.



Obrázek 33

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probanda 10B

diskuse : Delece v oblasti vzdálené 30 – 250 kb proximálně od 3' konce genu SHOX prokazatelně zasahují jeho regulační sekvence. Jejich delece způsobuje shodné fenotypické projevy jako delece kódujících sekvencí nebo některé bodové mutace. (srov. Benito-Sanz et al., 2006; Fukami et al., 2006) Deleci lze tedy považovat za kauzální příčinu postižení.

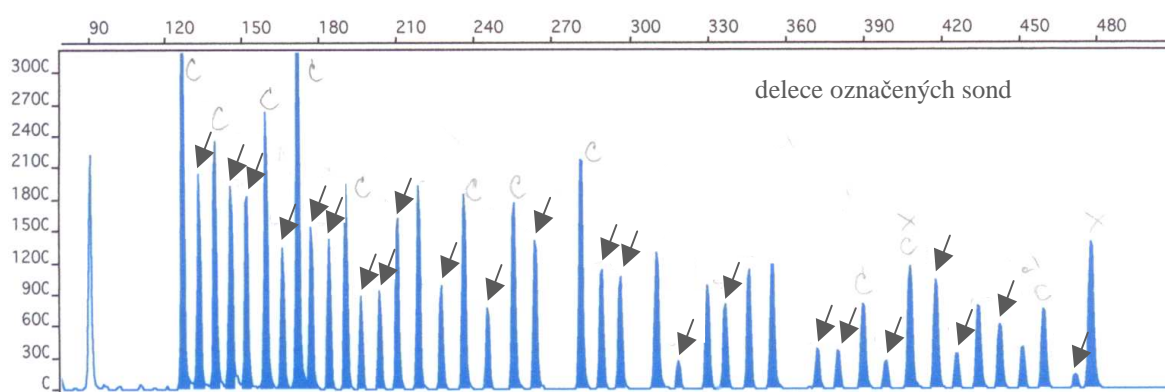
5.2.2.6 Proband 11B

rok narození : 1976

pohlaví : žena

diagnóza : dyschondrosteóza

molekulární nález : U probandky 11B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována rozsáhlá delece v oblasti PAR1 zahrnující gen SHOX a část přilehlých sekvencí. Centromerické místo zlomu se nalézá ve vzdálenosti 487,2 kb až 858,2 kb od 3' konce genu SHOX. Delece nezahrnuje vlastní telomerické sekvence ani X-specifické oblasti chromozómu.



Obrázek 34

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probandky 11B

diskuse : Delece genu SHOX je prokázanou kauzální příčinou dyschondrosteózy. Jelikož probandka 11B vykazuje deleci zahrnující celý gen, lze ji považovat za původce jeho postižení.

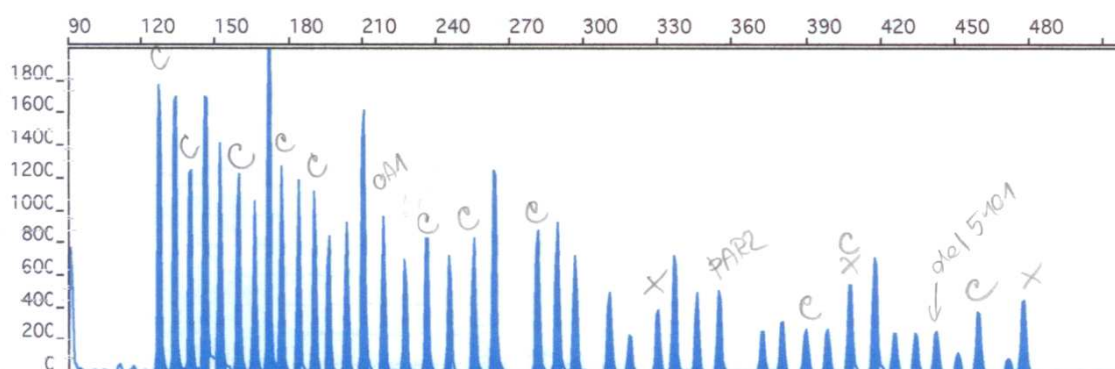
5.2.2.7 Proband 12B

rok narození : 1994

pohlaví : žena

diagnóza : idiopatický malý vzrůst

molekulární nález : U probandky 12B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována delece v oblasti vyšetřované sondou L5101.



Obrázek 35

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probandky 12B

diskuse : U probandky 12B byla detekována delece v PAR1, v oblasti vyšetřované sondou L5101, která by potenciálně mohla zasahovat i regulační elementy genu SHOX, jejichž delece může způsobovat shodná nebo obdobná postižení jako delece kódujících sekvencí genu SHOX (srov. Benito-Sanz et al., 2006). Delece v této konkrétní oblasti však byla pozorována i u zdravých jedinců (srov. Chen et al., 2009).

V tuto chvíli nedokážeme posoudit, zda se jedná o kauzální deleci, predispozici nebo pouze o populační variantu (viz kap. 5.2.4).

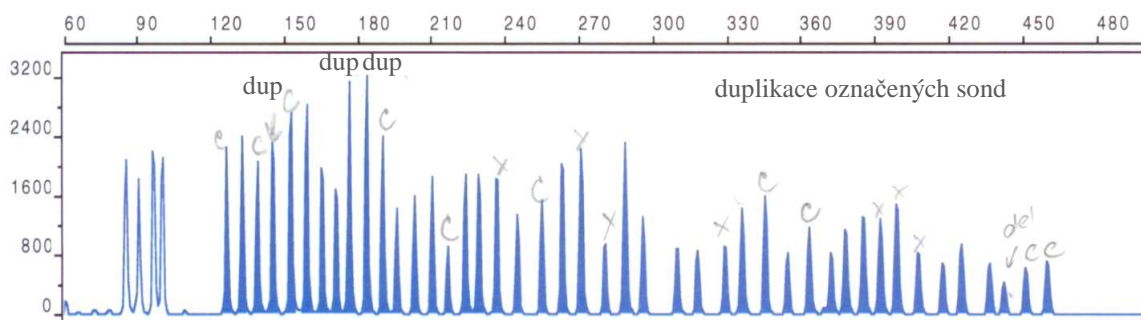
5.2.2.8 Proband 13B

rok narození : 1998

pohlaví : žena

diagnóza : idiopatický malý vzrůst

molekulární nález : U probandky 13B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována duplikace tří sond v oblasti PAR1. Délka duplikovaného úseku je přibližně 130 kb a zahrnuje potenciální regulační oblasti genu SHOX. Kódující sekvence nejsou dotčeny. Dále byla detekována malá delecce v oblasti vyšetřované sondou L5101.



Obrázek 36

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probandky 13B

diskuse : Duplikace zahrnující gen SHOX byly již v několika případech popsány a většinou spojeny s různě intenzivními fenotypovými projevy shodnými s případy delecce genu SHOX (srov. Thomas et al., 2009). Vzhledem k tomu, že gen SHOX duplikací zasažen není a že není jasné, zda duplikace zasahuje jeho regulační sekvence, nelze s jistotou posoudit vliv duplikace na fenotyp probanda.

Delecce v oblasti vyšetřované sondou L5101, by potenciálně mohla rovněž zasahovat regulační elementy genu SHOX, jejichž delecce může způsobovat shodná nebo obdobná postižení jako delecce kódujících sekvencí genu SHOX (srov. Benito-Sanz et al., 2006). Delecce v této konkrétní oblasti však byla pozorována i u zdravých jedinců (srov. Chen et al., 2009).

Více informací může přinést vyšetření rodiny nebo populační studie, případně srovnání s obdobnými případy, které by mohly být v budoucnu publikovány.

5.2.2.9 Proband 16B

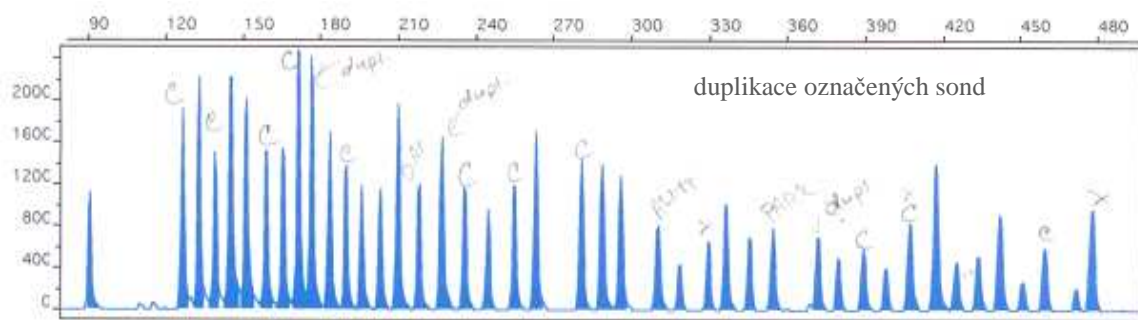
rok narození : 1996

pohlaví : žena

diagnóza : dyschondrosteóza

molekulární nález : U probandky 16B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována duplikace tří sond v oblasti PAR1. Délka duplikovaného úseku je přibližně 400 – 500 kb a nezasahuje kódující ani regulační sekvence genu SHOX.

Při sekvenaci kódujících oblastí genu SHOX byly zachyceny dvě substituce. První se nalézá v exonu 2 a nevede k záměně aminokyseliny p. Gly21Gly. Druhá leží v exonu 3 a jejím důsledkem je záměna aminokyseliny p. Arg121Cys.



Obrázek 37

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probandky 16B

diskuse : Duplikace zahrnující gen SHOX byly již v několika případech popsány a většinou spojeny s různě intenzivními fenotypovými projevy shodnými s případy delece genu SHOX (srov. Thomas et al., 2009). Vzhledem k tomu, že gen SHOX ani jeho regulační sekvence duplikací zasaženy nejsou, nelze s jistotou posoudit vliv duplikace na fenotyp probanda. Navíc tento případný vliv bude pravděpodobně „přehlušen“ vlivem mutace p. Arg121Cys. Aminokyseliny v pozici 117 – 176 SHOX proteinu tvoří klíčovou doménu, tzv. homeobox, a lze tedy s velkou jistotou pokládat mutaci p. Arg121Cys za kauzální a zodpovědnou za fenotyp probandky.

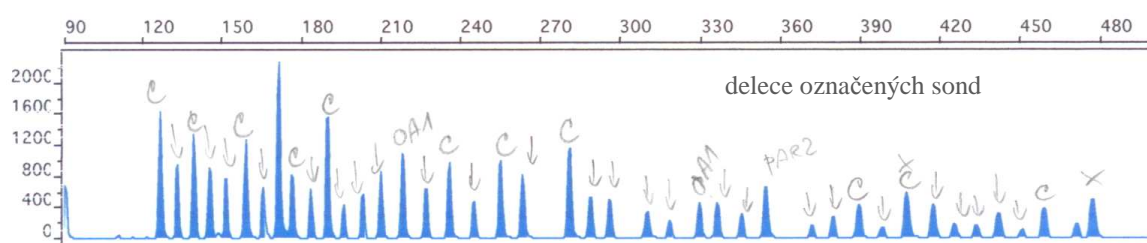
5.2.2.10 Proband 17B

rok narození : 1956

pohlaví : žena

diagnóza : dyschondrosteóza

molekulární nález : U probandky 17B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována intersticiální delecí v oblasti PAR1 zahrnující gen SHOX a část přilehlých sekvencí. Telomerické místo zlomu se nalézá ve vzdálenosti 4 kb až 273 kb od 5' konce genu SHOX. Delecí nezahrnuje vlastní telomerické sekvence ani X-specifické oblasti chromozómu.



Obrázek 38

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probandky 17B

diskuse : Delecí genu SHOX je prokázanou kauzální příčinou dyschondrosteózy. Jelikož probandka 17B vykazuje delecí zahrnující celý gen, lze ji považovat za původce jeho postižení.

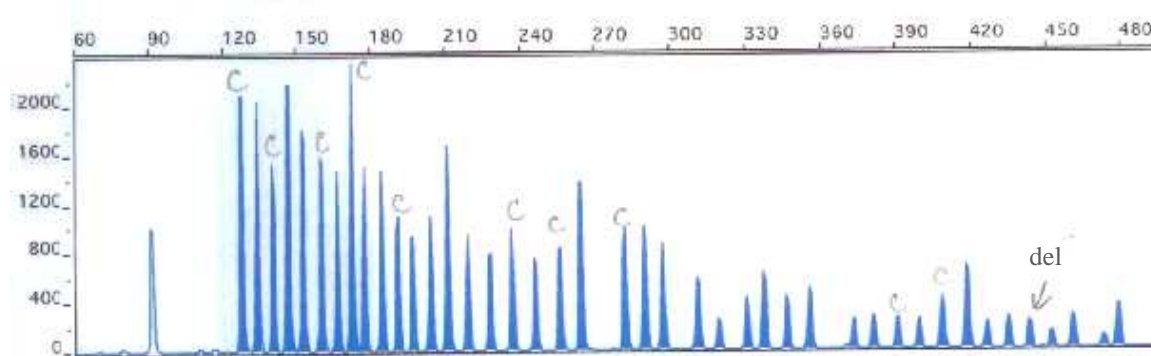
5.2.2.11 Proband 18B

rok narození : 1988

pohlaví : žena

diagnóza : idiopatický malý vzrůst

molekulární nález : U probandky 18B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována delece v oblasti vyšetřované sondou L5101.



Obrázek 39

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probandky 18B

diskuse : U probandky 18B byla detekována delece v PAR1, v oblasti vyšetřované sondou L5101, která by potenciálně mohla zasahovat i regulační elementy genu SHOX, jejichž delece může způsobovat shodná nebo obdobná postižení jako delece kódujících sekvencí genu SHOX (srov. Benito-Sanz et al., 2006). Delece v této konkrétní oblasti však byla pozorována i u zdravých jedinců (srov. Chen et al., 2009).

V tuto chvíli nedokážeme posoudit, zda se jedná o kauzální deleci, predispozici nebo pouze o populační variantu (viz kap. 5.2.4).

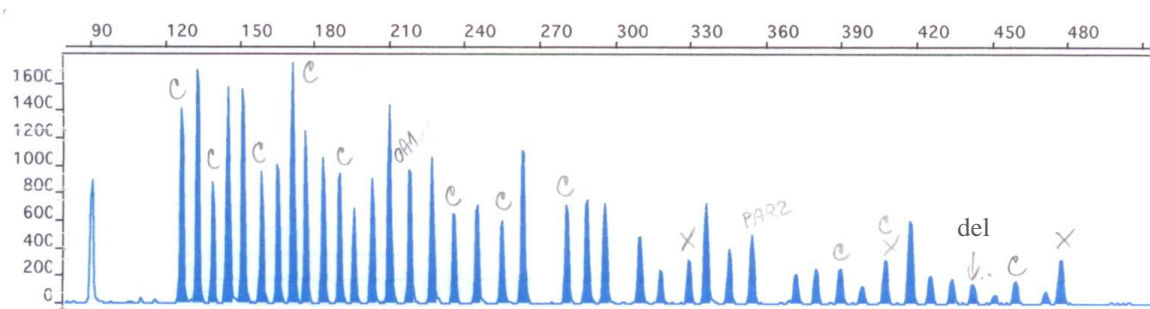
5.2.2.12 Proband 19B

rok narození : 1997

pohlaví : žena

diagnóza : idiopatický malý vzrůst

molekulární nález : U probandky 19B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována delece v oblasti vyšetřované sondou L5101.



Obrázek 40

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probandky 19B

diskuse : U probandky 19B byla detekována delece v PAR1, v oblasti vyšetřované sondou L5101, která by potenciálně mohla zasahovat i regulační elementy genu SHOX, jejichž delece může způsobovat shodná nebo obdobná postižení jako delece kódujících sekvencí genu SHOX (srov. Benito-Sanz et al., 2006). Delece v této konkrétní oblasti však byla pozorována i u zdravých jedinců (srov. Chen et al., 2009).

V tuto chvíli nedokážeme posoudit, zda se jedná o kauzální deleci, predispozici nebo pouze o populační variantu (viz kap. 5.2.4).

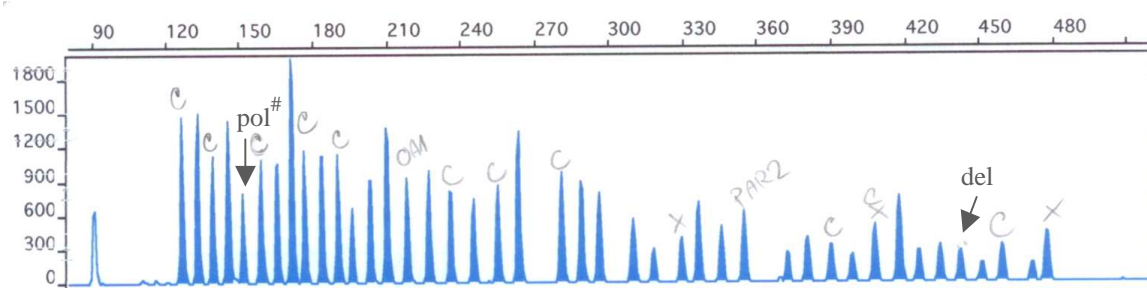
5.2.2.13 Proband 20B

rok narození : 2002

pohlaví : žena

diagnóza : idiopatický malý vzrůst

molekulární nález : U probandky 20B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována delece v oblasti vyšetřované sondou L5101.



Obrázek 41

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probandky 20B
(pol#... pokles sondy způsoben polymorfizmem pod sondou)

diskuse : U probandky 20B byla detekována delece v PAR1, v oblasti vyšetřované sondou L5101, která by potenciálně mohla zasahovat i regulační elementy genu SHOX, jejichž delece může způsobovat shodná nebo obdobná postižení jako delece kódujících sekvencí genu SHOX (srov. Benito-Sanz et al., 2006). Delece v této konkrétní oblasti však byla pozorována i u zdravých jedinců (srov. Chen et al., 2009).

V tuto chvíli nedokážeme posoudit, zda se jedná o kauzální deleci, predispozici nebo pouze o populační variantu (viz kap. 5.2.4).

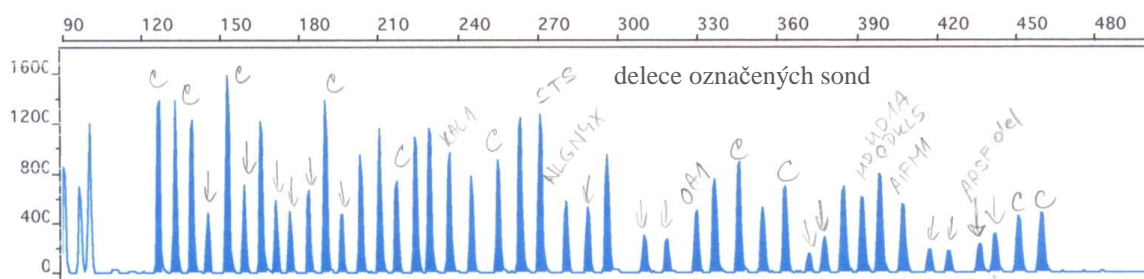
5.2.2.14 Proband 21B

rok narození : 1990

pohlaví : žena

diagnóza : dyschondrosteóza

molekulární nález : U probandky 21B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována rozsáhlá delece nezasahující kódující oblast genu SHOX, ale postihuje proximálně přilehlé sekvenční zahrnující regulační oblasti genu SHOX. Delece zasahuje také X-specifické oblasti chromozómu, konkrétně gen ARSF.



Obrázek 42

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probandky 21B

diskuse : Delece v oblasti vzdálené 30 – 250 kb proximálně od 3' konce genu SHOX prokazatelně zasahuje jeho regulační sekvenční. Jejich delece způsobuje shodné fenotypické projevy jako delece kódujících sekvencí nebo některé bodové mutace (srov. Benito-Sanz et al., 2006; Fukami et al., 2006). Deleci lze tedy považovat za kauzální příčinu postižení.

Mutace nebo ztráta genu ARSF je spojena s gonosomálně recesivním onemocněním chondrodysplazia punctata. Probandka je žena (tedy homogametické pohlaví) a tedy heterozygot, tudíž se ztráta genu ARSF u ní neprojevuje. Riziko postižení však hrozí 50 % jejich potenciálních synů. Její dcery budou s pravděpodobností 50 % přenašečky.

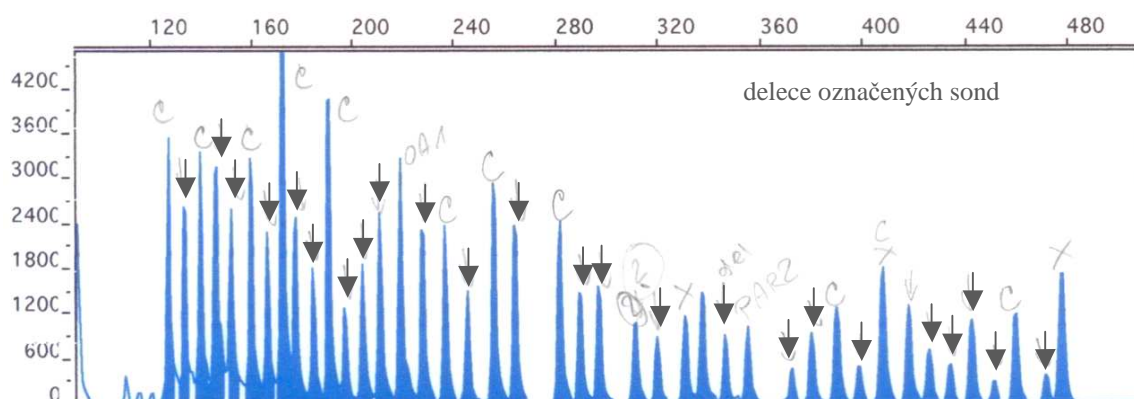
5.2.2.15 Proband 24B

rok narození : 1998

pohlaví : žena

diagnóza : dyschondrosteóza

molekulární nález : U probandky 24B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována rozsáhlá delece v oblasti PAR1 zahrnující gen SHOX a část přilehlých sekvencí. Delece byla detekována pod všemi sondami vyšetřujícími oblast PAR1. Delece nezahrnuje X-specifické oblasti chromozómu.



Obrázek 43

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probandky 24B

diskuse : Delece genu SHOX je prokázanou kauzální příčinou dyschondrosteózy. Jelikož probandka 24B vykazuje delecii zahrnující celý gen, lze ji považovat za původce jeho postižení.

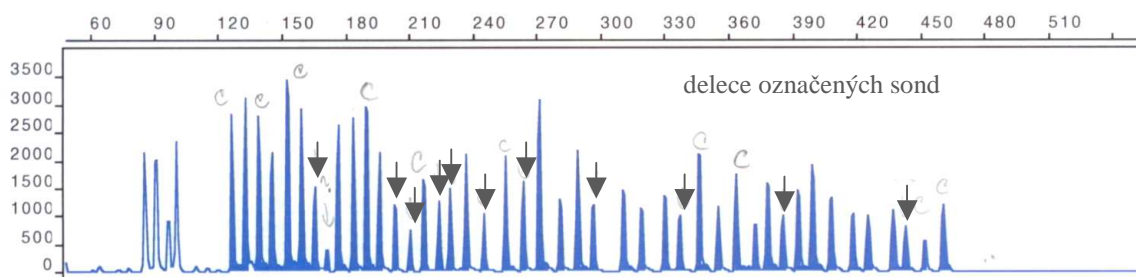
5.2.2.16 Proband 33B

rok narození : 1994

pohlaví : žena

diagnóza : dyschondrosteóza

molekulární nález : U probandky 33B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována subtelomerická delece v oblasti PAR1 zahrnující gen SHOX. Dále byla detekována malá delece v oblasti vyšetřované sondou L5101. Delece nezahrnují X-specifické oblasti chromozómu.



Obrázek 44

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probandky 33B

diskuse : Delece genu SHOX je prokázanou kauzální příčinou dyschondrosteózy. Jelikož probandka 33B vykazuje deleci zahrnující celý gen, lze ji považovat za původce jeho postižení.

Delece v PAR1, v oblasti vyšetřované sondou L5101, by potenciálně mohla zasahovat i regulační elementy genu SHOX, jejichž delece může způsobovat shodná nebo obdobná postižení jako delece kódujících sekvencí genu SHOX (srov. Benito-Sanz et al., 2006). Delece v této konkrétní oblasti však byla pozorována i u zdravých jedinců (srov. Chen et al., 2009). Vzhledem ke kauzální deleci zahrnující gen SHOX je však význam této delece v případě probandky 33B zanedbatelný.

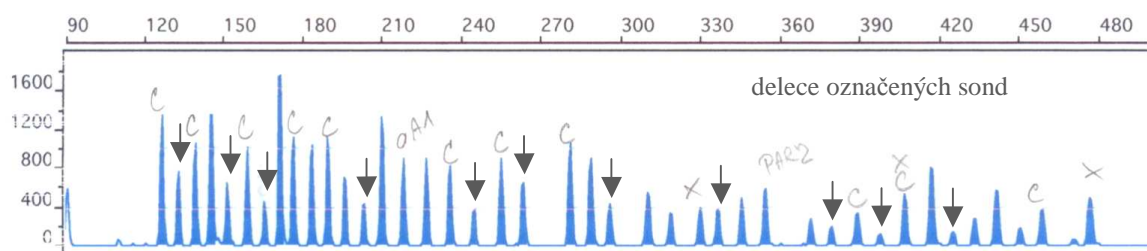
5.2.2.17 Proband 34B

rok narození : 1998

pohlaví : žena

diagnóza : dyschondrosteóza

molekulární nález : U probandky 34B byla pomocí metody MLPA (kit P018) detekována intersticiální delece v oblasti PAR1 zahrnující gen SHOX a část přilehlých sekvencí. Delece nezahrnuje vlastní telomerické sekvence ani X-specifické oblasti chromozómu.



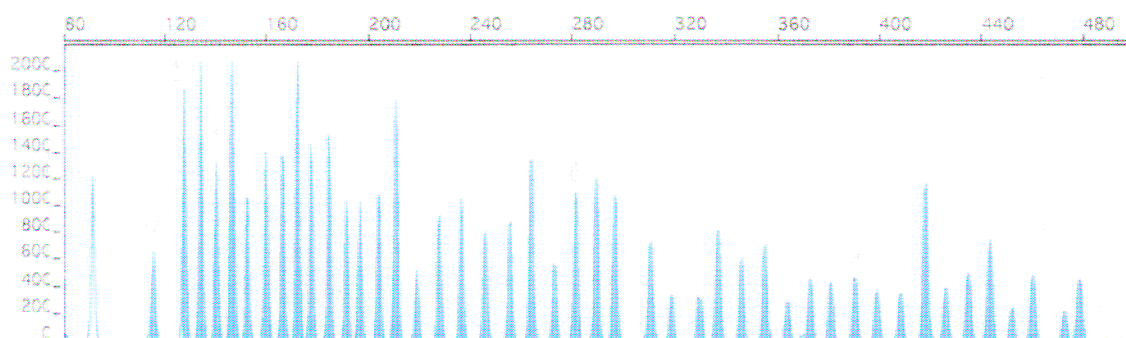
Obrázek 45

Výsledek vyšetření metodou MLPA (kit P018) probandky 34B

diskuse : Delece genu SHOX je prokázanou kauzální příčinou dyschondrosteózy. Jelikož probandka 34B vykazuje deleci zahrnující celý gen, lze ji považovat za původce jeho postižení.

5.2.2.18 Negativní kontroly

Vzhled MLPA s cca 50 ng DNA u negativní kontroly.

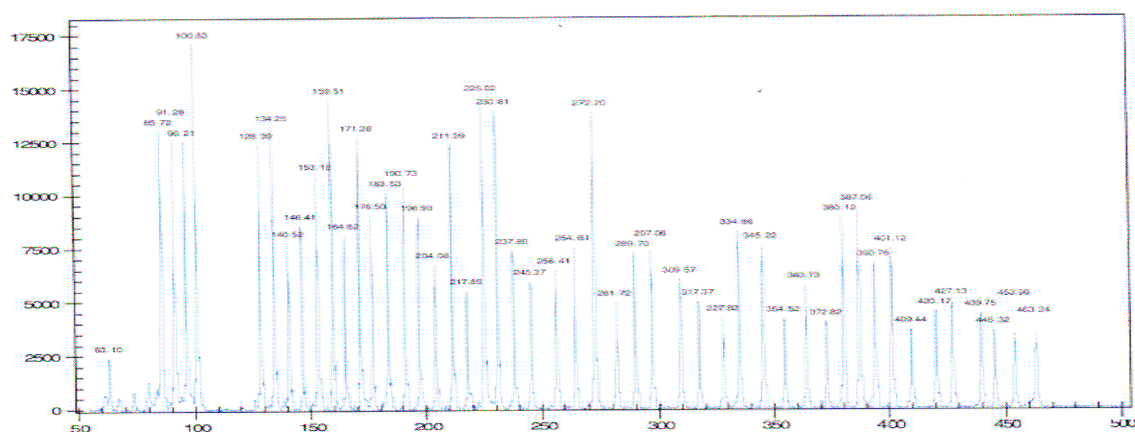


Obrázek 46

Výsledek vyšetření SALSA MLPA kit P018B (muž)

Vzorky 1B, 2B, 6B, 8B, 10B, 11B, 12B, 16B, 17B, 18B, 19B, 20B, 24B, 34B.

Vzhled MLPA s cca 50 ng DNA u negativní kontroly (převzato od MRC-Holland).



Obrázek 47

Výsledek vyšetření SALSA MLPA kit P018D (žena)

Vzorky 13B, 21B, 33B.

5.2.3 Sekvenace a varianty

U probandů, kterým nebyla detekována delece genu SHOX, byla provedena sekvenace exonů a vyhledány sekvenční varianty.

5.2.3.1 Exon 1

Charakteristika : nekódující sekvence a promotor

Tabulka 2

Primery pro exon 1

primer	délka	Tm	podíl GC
Forwarded	18 nt	63,59 °C	61,11 %
Reversed	22 nt	63,42 °C	50,00 %

Forwarded : 5'cggatccggagattcgct 3'

Reversed : 5'ggaaagttccaaaaccgagctc 3'

Délka produktu : 433 nt

Sekvenace :

cccggcggggcggaccgcggagagcgctgtcc**cgatccggagattcgct**tttctttgcgactgcggggctggcgcgcgcgcg
cgaggggtcagcacctgggcattggggtcaatgcaaccagggcaggtccctggggggccccaggagccaataggggtctt
cgagtcaccctgcggcc**gcctgctttgcccgggtcct**gagaacaggggctccccacactttt**tttttttggtttgtttatttcgtttc**
cgcgctctcttctactgcaaacagaaatgggaggggtggacagggcggtaggagcggatcagacgccaggacgcagcagc
ccgagtcgcgcacagggtttgccggagggtgaccgcgctggggacgccaggacgcgaatgaacctccggggcgcgctcgg
ggcctgcgctcagagcttggtgagctcggtttggaaactttctttctttccagaaa

červeně – primery; **hnědě** – prepisované sekvence; **zeleně** – varianty

Nalezené varianty (majoritní > minoritní varianta):

c. -686 G>C, c. -680 G>T, c. -644 T>G, c. -512 C>A, c. -507 G>C

5.2.3.2 Exon 2

Charakteristika : nekódující a kódující sekvence, které bylo třeba sekvenovat jako dva úseky (fragment „2a“ zahrnující většinu nekódujících sekvencí a fragment „2“ zahrnující zejména kódující sekvence)

Tabulka 3

Primery pro exon 2

primer	délka	Tm	podíl GC
Forwarded 2a	22 nt	66,86 °C	63,64 %
Reversed 2a	18 nt	69,05 °C	72,22 %
Forwarded 2	19 nt	71,47 °C	68,42 %
Reversed 2	20 nt	72,54 °C	75,00 %

Forwarded 2a : 5'cctcctctctccagccgtgaac 3'

Reversed 2a : 5'agccggggctggtggatg 3'

Forwarded 2 : 5'gagacgcgcgcacccacca 3'

Reversed 2 : 5'gaggcgccgaaccccaggag 3'

Délka produktu 2a : 458 nt

Délka produktu 2 : 382 nt

Sekvenace :

ggcgccttcctggaaagatccaggcgccgggctctgcgctcctcccgaggcgcaggggcgccggacgactggggac**cctcctc**
tccagccgtgaactccttgtctctgtctctctcagga**aa**actggagtttgc**ttt**ctccggccacggagagaacgcgggtaa
cctgtgtggggggctcgggcgcctgcgccccctcctgcgcgcgcgctctcccttccaaaatgggatctttcccccctcgcacca
aggtgtacggacgccaacagtgatgaaatgagaagaaagccaattgccggcctgggggggtgggggagacacagcgtctctgc
gtgcgtccgcgcggagcccggagaccagtaattgcaccagacaggcagcgcgatgggggggctgggcgaggtcgccgcgtata
aatagtgaatttcaatgga**g**aggcgtaaataacagcgcctggatccaccgcgcgcacggggcgctcctctccgcgcgggga
gacgcgcgc**atccaccgccccggct**gctcgcagccccggccccagcc**at**ggaagagctcacggcttttgatccaagtcttt
gaccagaaaagcaaggacggtaac**gg**gggagggcggagggcgcgaggtaagaaggattccattacgtaccgggaagtttgg
agagcggactggcgcgctccgggagctggggacgtcggattccagcctccaggacatcacggagggcgcgggccactgcc
cggtgcatttgtcaaggaccacgtagacaatgacaaggagaaactgaaagaattcggcaccgcgagagtggcagaaggtaa**gt**
tcctttgcgctccggctccagggggggcc**ctcctgggggttcggcgccct**cctcgcacggagtcggccccgcgcgccctcgtgt
gcacatttgcagctcccgctctgccagggtaaggccccggccgctcaggctttgcctaagaaaggaaggaaggcaggagtgga**c**
ccgaccggagacgcgggtgggtgggtagcgggggtgcgggggggaccagggagggtcgcagcggggggccgcgcgcgtggggc
accgacacgggaaggtcccggggctgggggtggatccgggtggtgtgcctgaagccg

červeně – primery 2a; modře – primery 2; nachově – překryv primerů forward 2 a reversed 2a; hnědě – prepisované sekvence; zeleně – varianty; atg – startovní kodón

Nalezené varianty (majoritní > minoritní varianta):

c. -112 G>A

c. +63 G>A : p. Gly(G)21Gly(G)

5.2.3.3 Exon 3

Charakteristika : kódující sekvence

Tabulka 4

Primery pro exon 3

primer	délka	Tm	podíl GC
Forwarded	19 nt	65,79 °C	63,16 %
Reversed	20 nt	66,32 °C	65,00 %

Forwarded : 5'aaaacctccccggcctcag 3'

Reversed : 5'gtggctgtacgcgtgctgtg 3'

Délka produktu : 331 nt

Sekvenace :

tcgtgcaaaagcccagggttttgggaaagcagcgagtatcctcctcggcttttgccttatggaccccacgcagttttgcgtcaaaagcg
cattggttttcgagggccccctttccaccgcgggatgcacgaaggggttcgccacgttgcgcaaaacctccccggcctcagccct
gtgccctccgctccccacgcagggatttatgaatgcaaagagaagcgcgaggacgtgaagtcggaggacgaggacgggcaga
ccaagctgaaacagaggcgcagcgcgaccaacttcacgctggagcagctgaacgagctcgagcgactcttcgacgagaccat
taccggacgccttcacgcgaggagctcagccagcgcctggggctctccgagggcgcgcgtgcaggttaggaacccggggggcg
ggggcggggggggcccggagccatcgcttggtcctcgggagcgcacagcacgcgtacagccacctgcgccggggccgccgc
gtccccctcccggagcgcggggagggttgggtgagggacgggctgggggtcctggacttttggagacgcctgaggcctgtaggat
gggttcattgcgtttgttttcaccaacagcaacaatatatatacatatataacaaataacaataaat

červeně – primery; hnědě – přepisované sekvence; zeleně – mutace

Nalezená mutace (majoritní > minoritní varianta) :

c. +361 C>T : p. Arg(R)121Cys(C)

5.2.3.4 Exony 4 a 5

Charakteristika : kódující sekvence v blízkém sousedství, proto sekvenované jako jeden úsek

Tabulka 5

Primery pro exony 4 a 5

primer	délka	Tm	podíl GC
Forwarded	19 nt	68,64 °C	73,68 %
Reversed	21 nt	68,30 °C	66,67 %

Forwarded : 5'gggaggctgggctgggttc 3'

Reversed : 5'aggggaaggagcagcaggtc 3'

Délka produktu : 379 nt

Sekvenace :

agacagaggggcggttaagtgtctgggcgcccaccatcagtcacctcccagctcccagaggtgcaaagtgcttggttcagcctcat
gggaaggatgctccctg**gggaggctgggctgggttc**acagggtcttcacatctctctctgcttctcccaag**gtttggttcagaa**
ccggagagccaagtccgcaacaagagaatcagatgcataaaggtgggtgtcgggactggggggacctgaagctgggggat
cctgtccaggaggatggggtgacgaggtgctggctacaccaggaccaccactgacacgtgctccctttggacacag**gc**
gtcatcttgggcacagccaaccacctagacgcctgccgagtggcacccctacgtcaacatgggagccttacggatgcctttccaac
aggtagctcactttttctctctgaagatccctagg**gacctgctgctcccttccctt**ccctatttgetgccgcatcctgacactcct
agtccctccctgccctgcagacttctcagctggcccttagaaaaaagcctctttccgaggaggcatttacaggcaccttggcac
ctatgaaatcaggctgggccaggcggggtggctcacacctgtcatccagcactttggg

červeně – primery; **hnědě** – prepisované sekvence

5.2.3.5 Exon 6a

Charakteristika : kódující a nekódující sekvence o celkové délce 2433 nt, proto sekvenovaný po terminační kodón

Tabulka 6

Primery pro exon 6a

primer	délka	Tm	podíl GC
Forwarded	19 nt	70,63 °C	73,68 %
Reversed	18 nt	74,48 °C	72,22 %

Forwarded : 5'ccatcctgcgccctcacc 3'

Reversed : 5'tgcaggacgcgcggtgca 3'

Délka produktu : 356 nt

Sekvenace :

cacggctggagaaggggcgacgctccctaggggagaagaggcacgttgagggttccgggggcgcggggcggagcaggcc
ccccagtcccatcctgcgccctcaccgcgccgggtccgctcccgaggtccaggctcagctgcagctggaaggcgtggccca
cgcgcacccgcacctgcaccgcacctggcggcgacgcgcctacctgatgtccccccgcgcaccttcgggctgcccacg
cgtcgctggccgagtcgcctcggccgcgcgctggcgccgcgcgccccaaaagcaacagcaagaattccagcatcgccga
cctgcgggtcaaggcgcggaagcacgcggaggccctggggctctgacccgcgcgcagccccccgcgcgcccggactccc
gggctccgcgcaccccgctgcaccgcgcgtctgcactcaacccgcctggagctccttcgcggccaccgtgctccgggca
ccccgggagctcctgcaagaggcctgaggaggaggtcccgggaccgtccacgcacgaccagccagaccctcgcggaga
tggtgcagaaggcggagcgggtgagcgg

červeně – primery; hnědě – prepisované sekvence; tga – terminační kodón

5.2.3.6 Exon 6b

Charakteristika : kódující a nekódující sekvence

Tabulka 7

Primery pro exon 6b

primer	délka	Tm	podíl GC
Forwarded	20 nt	61,60 °C	50,00 %
Reversed	22 nt	61,82 °C	54,55 %

Forwarded : 5'ttcaccgtgtagccaggaa 3'

Reversed : 5'ggatcacctgaggtcaggagtt 3'

Délka produktu : 342 nt

Sekvenace :

tgggactacaggcgccccgccaccgcgccccggctaatttttgtatttttagtagagacggggtttcaccgtgtagccaggaaaggtct
cgatctcctgacctcatgatccgtccgcctcagcctcccaaagtgtgggactacaggcgtgagccactgcacttggcctttttttt
ttagatggagttttgctcttgcgcgccaggtggagtataatggcatgagtctcgactcactgcaacctccgcctcccgagttcaagcg
attctcctgcctcagcctcccgagtagctgggattacaggtgccaccaccatgtcaagataatgtttgtatttcagtagagatgggg
tttgaccatgttggccaggctggtctcgaaactcctgacctcaggtgatccacccgccttagcctcccaaagtgtgggatgacaggc
gtgagcccctgcgccccggcctttgtaactttatttta

červeně – primery; hnědě – prepisované sekvence; zeleně – mutace; tga – terminační kodón

Nalezená varianta (majoritní > minoritní varianta) :

c. +656 A>G : p. Pro(P)219Pro(P)

5.2.4 Populační studie

Oblasti vzdálené 30 – 250 kb proximálně od 3' konce genu SHOX prokazatelně obsahují jeho regulační sekvence. Jejich delece způsobuje shodné fenotypické projevy jako delece kódujících sekvencí nebo některé bodové mutace (Benito-Sanz et al., 2006; Fukami et al., 2006). Avšak u některých zdravých jedinců byly v této oblasti nalezeny delece malého rozsahu, které nebyly jednoznačně spojeny s patologickými projevy (srov. Chen et al., 2009). Náš soubor zahrnuje 7 probandů, u kterých byla detekována izolovaná malá delece v oblasti vyšetřované sondou L5101 a 2 probandy, u nichž byla nalezena ve spojení s delecí genu SHOX (v jednom případě) a s duplikací v oblasti PAR1. Všem těmto probandům byl diagnostikován idiopatický malý vzrůst. (Delece byla také nalezena u jedné probandky s dyschondrosteózou, která však měla zároveň deletované kódující sekvence genu SHOX.) Jedná se o oblast vzdálenou cca 150 kb od 3' konce genu SHOX o velikosti menší než 17 kb (vzdálenost od sondy L5101 k distálně sousedící sondě je 5,4 kb, k proximálně sousedící 11,6 kb).

Abychom mohli lépe posoudit, zda se jedná o kauzální delecí s neúplnou penetrancí, predispozici nebo pouze o populační variantu, provedli jsme srovnání s referenční skupinou, již tvořil populační soubor čítající 120 nepříbuzných jedinců (60 mužů a 60 žen). Tato skupina byla vyšetřena pomocí metody real-time PCR a k tomuto souboru bylo připojeno i několik jedinců z našeho původního souboru, u nichž byla známa přítomnost či nepřítomnost delece, kvůli přesnější interpretaci výsledků. Následně byly porovnány hodnoty C_t (resp. rozdíly mezi hodnotou C_t pro vyšetřovanou oblast a hodnoty C_t pro oblast genu GADPH) změřené u jednotlivých jedinců (reakce probíhaly v tripletech a výsledné hodnoty byly po vyloučení extrémů zprůměrovány). C_t vyjadřuje cyklus, během něhož překoná zachycený fluorescenční signál předem zadanou hodnotu.

Pro oblast sondy L5101 jsme použili následující primery. Délka produktu je 216 nt.

Tabulka 8

Primery pro oblast L5101

primer	délka	Tm	podíl GC
Forwarded	20 nt	59,58 °C	50,00 %
Reversed	24 nt	59,44 °C	41,67 %

Forwarded : 5'agacacagtcgggaaatcgt 3'

Reversed : 5'gtatccgagaaataccaaaagagg 3'

Pro gen GADPH jsme použili komerčně dostupné primery (Applied Biosystems).

Protože výchozí koncentrace DNA jednotlivých vzorků byla různá, očekávali jsme, že naměříme různé absolutní hodnoty c_t . Rozdíly mezi c_t pro L5101 a pro GADPH (od c_t L5101 jsme c_t odečetli GADPH) by však měly být ve všech případech shodné (neboť vychází ze stejného vzorku DNA). Resp. by tento rozdíl měl hypoteticky být dokladem přítomnosti (či nepřítomnosti delece). Pokud bychom, teoreticky, pro vzorky bez delece získali rozdíl c_t o velikosti (n), pro vzorky s heterozygotní delecí v oblasti L5101 bychom měli získat hodnotu (n+1). Množství templátové DNA by v takovém případě bylo vlastně poloviční a hodnota c_t pro amplifikát L5101 by se tedy o 1 zvýšila, neboť amplifikát během cyklů přibývá exponenciálně (vždy se zdvojnásobí). Pokud by vzorek obsahoval homozygotní delecí oblasti L5101, neměl by vznikat žádný amplifikát, tudíž signál by měl být nulový. Předpokládaným teoretickým nálezem by tedy měla být jedna skupina jedinců, kteří by neměli delecí a u kterých by byla naměřena přibližně stejná hodnota rozdílů c_t , dále skupina heterozygotních jedinců, u nichž by naměřené hodnoty rozdílů c_t byly o 1 vyšší, a potenciálně i třetí skupina jedinců, kteří by byli nositeli homozygotní delece a u nichž by nebyly naměřeny žádné hodnoty.

Na základě těchto předpokladů jsme tedy provedli sérii reakcí. Výsledky bohužel vůbec neodpovídají našemu očekávání (viz příloha č.10). Namísto dvou diskrétních skupin jsme získali kontinuum hodnot rozdílů c_t , v němž zdraví jedinci dosáhli hodnot c_t od -0,24 až do 3,77, tj. rozpětí čtyř cyklů. Mezi hodnotami -0,24 a 1,33 roste kontinuum pozvolna plynule (zahrnuje asi 85 % jedinců), zbylé hodnoty se zvyšují už příkře a nepravidelně (viz příloha č.10, graf 1). Ani začlenění kontrolních jedinců se známým stavem se neukázalo jako efektivní, hodnoty jedinců bez delece a heterozygotních nejsou odlišeny, ale překrývají se (viz příloha č.10, graf 1). Dokonce i u začleněného jedince s homozygotní delecí, u něhož by neměl být zachycen signál pro oblast L5101, byl signál zachycen. To však není tak překvapivé, neboť praxe ukazuje, že měřicí přístroj často detekuje signál v posledních cyklech i u kontrolních vzorků, do kterých se vůbec nepřidává templátová DNA (A. Hořínek, osobní sdělení).

Interpretovat tato data ve smyslu předpokladů nelze. Můžeme se domnívat, že někteří jedinci s vyššími hodnotami rozdílu c_t jsou nositeli delece, avšak zodpovědně toto tvrdit není možné. Srovnání se tedy nezdařilo, je neprůkazné.

Je otázkou, co je příčinou toho, že získané výsledky neodpovídají předpokladům, resp. že nesouhlasí s teoretickým principem analýzy. Zdá se nám pravděpodobné, že příčinou by mohly být různé nespecifické interakce primerů s templátem. Amplifikáty takovýchto nasednutí by mohly výsledky výrazně zkreslovat, zvláště pokud by k nim docházelo na různých místech templátu a v různém množství. Pozornost v tomto směru bychom měli při dalším zkoumání věnovat i otázce rozdílů mezi pohlavími. Pokud porovnáme hodnoty změřené u mužů a žen zvlášť, zjistíme, že hodnoty rozdílu c_t jsou u mužů výrazně vyšší (viz příloha č.10, graf 2). To by zasloužilo další zkoumání a důkladné statistické zpracování, neboť by z takovýchto rozdílů mohly být odvozeny další závěry (např. ohledně role chromozómu X v nespecifických interakcích – nižší hodnoty rozdílu c_t u žen by mohly být důsledkem většího množství nespecifických interakcí primerů se dvěma chromozómy X, oproti nižšímu množství interakcí s pouze jedním chromozómem X u mužů). Bez dalšího zkoumání se však jedná o pouhé hypotézy.

Podstatný bude další postup pro nové provedení populační studie. Metoda real-time PCR s použitím interkalačního barviva se ukázala jako nevhodná. Nabízí se možnost použití jiných, specifitějších primerů, nicméně vzhledem k citlivosti real-time PCR by mohlo výsledky pravděpodobně zkreslit i malé množství nespecifických interakcí primerů s templátem. Spolehlivější se nám zdá použití real-time PCR se specifickou sondou TaqMan do cílové oblasti. Tak by měl být cílový lokus určen již dostatečně specificky, aby to odpovídalo citlivosti real-time PCR a aby populační studie proběhla zdárně.

5.2.5 Indikační protokol

Indikace k molekulárně genetickému vyšetření genu SHOX a přilehlých oblastí je poněkud problematická. Dochází k situacím, kdy je vyšetření doporučeno pacientům, kteří nevykazují typické klinické projevy a jejichž postižení má jinou prokazatelnou příčinu, a naopak není doporučeno pacientům, u nichž by mohlo být úspěšné. Dále by bylo vhodné odlišit pacienty, u kterých je postačující provést vyšetření na přestavby v oblasti PAR1 metodou MLPA, od těch, u nichž by v případě negativního výsledku MLPA bylo účelné provést sekvenaci genu pro hledání případných mutací. Pro snadnější a přesnější indikaci

vyšetření genu SHOX a přilehlých oblastí jsme (v úzké spolupráci s klinickou genetičkou doc. MUDr. Alicí Baxovou, CSc.) navrhli indikační protokol, jehož použití by mohlo lékaři usnadnit rozhodování o indikaci (viz příloha č.11). Při jeho sestavení jsme využili zkušenosti a postupy použité Rappoldem et al., dostatečně prověřené a publikované (Rappold et al., 2007).

5.2.6 Shrnutí

Vyšetřeno bylo 40 indikovaných probandů (z toho 29 pohlaví ženského, 11 mužského) metodou MLPA (viz příloha č.9). Z toho 11 probandům (27,5 %; 10 žen, 1 muž) byla diagnostikována dyschondrosteóza (DYS) a 29 probandům (72,5 %; 19 žen, 10 mužů) idiopatický malý vzrůst (idiopathic short stature, ISS).

Kauzální delece byla nalezena u probandů 6B, 11B, 17B, 24B, 33B a 34B, a to delece kódujících sekvencí genu SHOX, a u probandů 10B a 21B, a to delece v prokázaných regulačních oblastech genu SHOX (srov. Benito-Sanz et al., 2006; Fukami et al., 2006). Podíl probandů s pozitivním nálezem (podrobnosti viz kap. 5.2.1) je v případě pacientů s dyschondrosteózou (63,6 %) o málo menší, než bylo očekáváno (srov. Hintz, 2002; Kosho et al., 1999; Ogata et al., 2002), v případě pacientů s idiopatickým malým vzrůstem (3,4 %) odpovídá očekávání (srov. Rappold et al., 2002).

Nejasnější situace je u probandů 13B a 16B, u nichž byla detekována duplikace v oblasti PAR1, která však nezasahuje ani kódující sekvence genu SHOX ani sekvence, u nichž byl prokázán regulační vliv. Duplikace v oblasti PAR1 se vyskytují velmi zřídka a jsou spojeny s velmi variabilním fenotypem (srov. Thomas et al., 2009). U probanda 16B však byly nalezeny i dvě bodové mutace. První mutace, v exonu 2, nevede k záměně aminokyseliny (p. Gly21Gly) a její vliv je tedy pravděpodobně zanedbatelný. Druhá mutace byla nalezena v exonu 3, v úseku sekvence genu SHOX kódujícím homeodoménu (aminokyseliny v pozici 117 – 176) a vede k záměně aminokyseliny (p. Arg121Cys). Vzhledem k výrazně odlišným vlastnostem aminokyselin (velikost i náboj) a vzhledem k lokalizaci mutace v oblasti klíčové homeodomény můžeme předpokládat, že tato mutace je kauzální, a tedy zodpovědná za postižení probanda. Tento závěr podporují i nálezy podobných kauzálních delecí (např. Grigellione et al., 2000) a přehledové studie (např. Leka et al., 2006; Rappold et al., 2002). V případě probanda 16B je tudíž vliv duplikace

v PAR1 neposuzovatelný. U probanda 13B byla navíc nalezena delece v oblasti vyšetřované sondou L5101.

U ostatních probandů nebyla nalezena přestavba, kromě probandů 1B, 2B, 8B, 12B, 18B, 19B a 20B, u kterých byla nalezená drobná delece v PAR1, v oblasti vyšetřované sondou L5101, která by potenciálně mohla zasahovat i regulační elementy genu SHOX. Obdobné delece byly detekovány u jedinců se shodnými klinickými projevy jako mají jedinci postižení delecí kódujících sekvencí genu SHOX (srov. Benito-Sanz et al., 2006), ale byla pozorována též u zdravých jedinců (srov. Chen et al., 2009). Stanovení a srovnání frekvence této delece v populačním souboru se nezdařilo a nepřineslo jednoznačný výsledek.

Při sekvenaci exonů genu SHOX byly nalezeny bodové varianty v exonech 1, 2, 3 a 6b. V exonu 1 bylo nalezeno 5 různých variant v sekvenci, která je sice transkribovaná, avšak není kódující – nemá tedy přímý vliv na aminokyselinovou strukturu proteinu. Zda mohou tyto mutace mít nějaký regulační vliv na transkripci, bude možné lépe posuzovat po provedení srovnávací populační studie. V exonu 2 byly zachyceny 2 bodové varianty, avšak pouze 1 z nich v kódující sekvenci. Jedná se o „samesense“ mutaci c. +63 G>A, jež nevede k záměně aminokyseliny – jedná se o výše zmíněnou mutaci p. Gly21Gly. V exonu 3 byla nalezena pouze 1 bodová varianta, a to „missense“ mutace c. +361 C>T v kódující sekvenci, způsobující výše popsanou záměnu aminokyseliny p. Arg121Cys. V exonu 6b byla zachycena také 1 bodová varianta, „samesense“ mutace c. +656 A>G, která nevede k záměně aminokyseliny (p. Pro219Pro).

V rámci dalšího výzkumu bychom se rádi zaměřili na přesnou lokalizaci a popis delecí, dokončili vyšetření rodinných příslušníků a budeme také průběžně rozšiřovat soubor probandů o nově vyšetřené případy. Nalezené bodové varianty v úsecích sekvence s potenciálním regulačním vlivem plánujeme porovnat s populační studií.⁵

⁵ Výsledky tohoto výzkumu by měly být součástí autorovy disertační práce.

6. Závěr

V rámci výzkumu, k jehož výstupům patří i tato práce, jsme vyšetřili dva soubory pacientů s podezřením na kryptickou chromozómovou přestavbu.

První soubor zahrnuje 50 probandů s podezřením na mikroleční syndrom, u 8 z nich (16 %) byla kryptická přestavba nalezena. Z toho 4 případy patří k typickým, dobře popsaným mikrolečními syndromům. Další 2 případy vykazují delece v dalších typických regionech podléhajících mikrolecím, avšak mají ne zcela obvyklou velikost a lokalizaci. V případě posledních dvou pacientů jde o přestavby (deleci a duplikaci v odlišných regionech), které se vyskytují poměrně vzácně a jsou spojovány s variabilním fenotypem. Budoucí podrobnější zkoumání pacientů s netypickými a vzácnými nálezy by potenciálně mohlo přinést nové relevantní informace o vlivu těchto kryptických přestaveb na lidskou patologii a o lokalizaci, funkci a patologii zasažených genů.

Druhý soubor zahrnuje 40 probandů (11 s diagnostikovanou dyschondrosteózou, 29 s idiopatickým malým vzrůstem) s podezřením na patologii genu SHOX. U 8 probandů (7 s dyschondrosteózou a 1 s idiopatickým malým vzrůstem) byla skutečně nalezena delece v kódující sekvenci genu SHOX nebo v přilehlých regulačních oblastech. U 2 probandů (1 s dyschondrosteózou a 1 s idiopatickým malým vzrůstem) byla v PAR1 oblasti detekována duplikace – u probanda s dyschondrosteózou byla však zároveň nalezena pravděpodobně kauzální bodová „missense“ mutace v oblasti tzv. homeoboxu. Klinický význam takovýchto duplikací je stále nejasný. U 7 probandů s idiopatickým malým vzrůstem byla nalezena izolovaná malá delece potenciální regulační oblasti genu SHOX. Srovnání s populačním vzorkem jedinců se nezdařilo a nepřineslo jednoznačný výsledek. U probandů, kterým nebyla detekována delece genu SHOX, byla provedena sekvenace exonů a vyhledány sekvenční varianty. Nalezli jsme jednu kauzální „missense“ mutaci a dvě „samesense“ mutace v kódující části genu a 6 mutací v transkribované, ale nekódující části genu. Jejich další zkoumání může přinést důkazy o potenciálním regulačním vlivu těchto mutací.

V obou souborech odpovídá počet pozitivních nálezů očekávání a je v souladu s jinými studiemi. Při obojím vyšetřování se dobře osvědčila metoda MLPA (jak pro celogenomové vyšetření, tak pro podrobné zkoumání distální části chromozómu X) a potvrdili jsme její pozitivní přínos ve vědecké i klinické praxi.

Použité zkratky

Arg ...	argnin
CGH ...	comparative genomic hybridization (srovnávací genomová hybridizace)
CNV ...	copy number variation
Cys ...	cystein
ddNTP ...	dideoxyribonukleotidy
del ...	delece
DMSO ...	dimethylsulfoxid
dup ...	duplokace
EDTA ...	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELN ...	elastin
FISH ...	fluorescent in situ hybridization (fluorescenční in situ hybridizace)
GABRD ...	GABA receptor delta-subunit gene
GADPH ...	glyceraldehydfosfátdehydrogenáza
Gly ...	glycin
HDR ...	hypoparathyroidismus, sensorineurální hluchota, renální abnormality (syndrom)
ISS ...	idiopathic short stature (idiopatický malý vzrůst)
KDDL ...	klinika dětského a dorostového lékařství
LCR ...	low copy repeats
mFISH ...	multicolour FISH
MLPA ...	multiplex ligation-dependent probe amplification
mRNA ...	mediátorová RNA
OLG ...	oddělení lékařské genetiky
PAR1 ...	psoudoautosomální region 1
PCR ...	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PHOG ...	pseudoautosomal homeobox-containing osteogenic gene
Pro ...	prolin
SHOT ...	SHOX homologous gene on the chromosome three
SHOX ...	short stature homeobox-containing gene
SKY ...	spectral karyotyping
SNP ...	single nucleotid polymorphism
ssDNA ...	single strand DNA (jednořetězcová DNA)
TAR ...	telomere associated repeats
T _m ...	teplota tání

Citovaná literatura

(*) literatura citovaná sekundárně

- Ballabio A, Bardoni B, Carrozzo R, Andria G, Bick D, Campbell L, Hamel B, Ferguson-Smith MA, Gimelli G, Fraccaro M, Maraschio P, Zuffardi O, Guioli S, Camerino G** (1989) Contiguous gene syndrome due to deletions in the distal short arm of the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 10001-10005
- Ballif BC, Sulpizio SG, Lloyd RM, Minier SL, Theisen A, Bejjani BA, Shaffer LG** (2007) The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH. *Am J Med Genet*, 143A, 1850-1857
- Benito-Sanz S, Gorbenko del Blanco D, Aza-Carmona M, Magano LF, Lapunzina P, Argente J, Campos-Barros A, Heath KE** (2006) PAR1 deletions downstream of SHOX are the most frequent defect in a Spanish cohort of Léri-Weill dyschondrosteosis. *Hum Mutat*, 27 (10), 1062
- Berend SA, Spikes AS, Kashork CD, Wu JM, Daw SC, Scambler PJ, Shaffer LG** (2000) Dual-probe fluorescence in situ hybridization assay for detecting deletions associated with VCFS/DiGeorge syndrome I and DiGeorge syndrome II loci. *Am J Med Genet*, 91, 313-317
- Blashke RJ, Monaghan AP, Schiller S, Schechinger B, Rao E, Padilla-Nash H, Ried T, Rappold GA** (1998) SHOT, a SHOX-related homeobox-gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 2406-2411
- Blaschke RJ, Rappold GA** (2000) SHOX: Growth, Léri-Weill and Turner syndromes. *Trends Endocrinol Metab*, 11, 227-230
- Botto LD, May K, Fernhoff PM, Correa A, Coleman K, Rasmussen SA, Merritt RK, O'Leary LA, Wong LY, Elixson EM, Mahle WT, Campbell RM** (2003) A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics*, 112, 101-107
- Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, FitzPatrick D** (1998) A chromosomal deletion map of human malformations. *Am J Hum Genet*, 63, 1153-1159
- Cardoso C, Leventer RJ, Ward HL, Toyo-Oka K, Chung J, Gross A, Martin CL, Allanson J, Pilz DT, Olney AH, Mutchinick OM, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A, Dobyns WB, Ledbetter DH** (2003) Refinement of a 400-kb critical region allows genotypic differentiation between isolated lissencephaly, Miller-Dieker syndrome, and other phenotypes secondary to deletions of 17p13.3. *Am J Hum Genet*, 72, 918-930
- Carlson C, Sirotkin H, Pandita R, Goldberg R, McKie J, Wadey R, Patanjali SR, Weissman SM, Anyane-Yeboah K, Warburton D, Scambler P, Shprintzen R, Kucherlapati R, Morrow BE** (1997) Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo-cardio-facial syndrome patients. *Am J Hum Genet*, 61, 620-629
- Cassidy SB, Dykens E, Williams CA** (2000) Prader-Willi and Angelman syndromes: sister imprinted disorders. *Am J Med Genet*, 97, 136-146
- Clayton-Smith J, Laan L** (2003) Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *J Med Genet*, 40, 87-95
- Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, Robson SC, Binder G, Glass I, Strachan T, Lindsay S, Rappold GA** (2000) The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet*, 9, 695-702
- Conrad DR, Andrews TD, Carter NP, Hurles ME, Pritchard JK** (2006) A high resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat Genet*, 38, 75-81
- Davis RM** (1981) Localization of male determining factors in man: A thorough review of structural anomalies of the Y chromosome. *J Med Genet*, 18, 161-195
- DeSilva U, Elnitski L, Idol JR, Doyle JL, Gan W, Thomas JW, Schwartz S, Dietrich NL, Beckstrom-Sternberg SM, McDowell JC, Blakesley RW, Bouffard GG, Thomas PJ, Touchman JW, Miller W, Green ED** (2002) Generation and comparative analysis of approximately 3.3 Mb of mouse genomic sequence orthologous to the region of human chromosome 7q11.23 implicated in Williams syndrome. *Genome Res*, 12(1), 3-15

- De Vries BBA, van den Ouweland AMW, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Mol E, Gelsema K, van Rijn M, Halley DJJ, Sandkuijl LA, Oostra BA, Tibben A, Niermeijer** (1997) Screening and diagnosis for the Fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. *Am J Hum Genet*, 61, 660-667
- De Vries BBA, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C** (2003) Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet*, 40, 385-398
- Dobyns WB, Curry CJ, Hoyme HE, Turlington L, Ledbetter DH** (1991) Clinical and molecular diagnosis of Miller-Dieker Syndrome. *Am J Hum Genet*, 48, 584-594
- Doyle TF, Bellugi U, Korenberg JR, Graham J** (2004) „Everybody in the world is my friend“ – hypersociability in young children with Williams syndrome. *Am J Med Genet*, 124A, 263-273
- Ellison JW, Wardak Z, Young MF, Gehron Robey P, Laig-Webster M, Chiong W** (1997) PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet*, 6, 1341-1347
- Fernández L, Lapunzina P, Arjona D, López Pajares I, Garcia-Guereta L, Elorza D, Burgueros M, De Torres ML, Mori MA, Palomares M, García-Alix A, Delicado A** (2005) Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Genet*, 68, 373-378
- Flanagan SF, Munns CFJ, Hayes M, Williams B, Berry M, Vickers D, Rao E, Rappold GA, Batch JA, Hyland VJ, Glass IA** (2002) Prevalence of mutations in the short stature homeobox containing gene (SHOX) in Madelung deformity of childhood. *J Med Genet*, 39, 758-763
- Flint J, Bates GP, Clark K, Dorman A, Willingham D, Roe BA, Micklem G, Higgs DR, Louis EJ** (1997) Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet*, 6, 1305-1314
- Frangiskakis JM, Ewart AK, Morris CA, Mervis CB, Bertrand J, Robinson BF, Klein BP, Ensing GJ, Everett LA, Green ED, Pröschel C, Gutowski NJ, Noble M, Atkinson DL, Odelberg SJ, Keating MT** (1996) LIM-kinase1 hemizyosity implicated in impaired visuospatial constructive cognition. *Cell*, 86, 59-69
- Fukami M, Kato F, Tajima T, Yokoya S, Ogata T** (2006) Transactivation function of a ~800bp evolutionarily conserved sequence at the SHOX 3' region: Implication for the downstream enhancer. *Am J Hum Genet*, 78, 167-170
- Gajecka M, Mackay KL, Shaffer LG** (2007) Monosomy 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet*, 145C, 346-356
- Gerdes M, Solot C, Wang PP, Moss E, LaRossa D, Randall P, Goldmuntz E, Clark BJ, Driscoll DA, Jawad A, Emanuel BS, McDonald-McGinn DM, Batshaw ML, Zackai EH** (1999) Cognitive and behavior profile of preschool children with chromosome 22q11.2 deletion. *Am J Med Genet*, 85, 127-133
- Greenberg F, Guzzetta V, Montes de Oca-Luna R, Magenis RE, Smith ACM, Richter SF, Kondo I, Dobyns WB, Patel PI, Lupski JR** (1991) Molecular analysis of the Smith-Magenis syndrome: a possible contiguous gene syndrome associated with del(17)(p11.2). *Am J Hum Genet*, 49, 1207-1218
- Grigeliuniene G, Eklöf O, Ivarsson SA, Westphal O, Neumeyer L, Kedra D, Dumanski J, Hagenäs L** (2000) Mutations in short stature homeobox containing gene (SHOX) in dyschondrosteosis but not in hypochondroplasia. *Hum Genet*, 107, 145-149
- Gropman AL, Elsea S, Duncan WC Jr, Smith ACM** (2007) New developments in Smith-Magenis syndrome (del 17p11.2). *Curr Opin Neurol*, 20(2), 125-34
- Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Lewis RA, Stal S, Kashork CD, Bacino CA, Shapira SK, Shaffer LG** (2003) Physical map of 1p36, placement of breakpoints in monosomy 1p36, and clinical characterization of the syndrome. *Am J Hum Genet*, 72, 1200-1212
- Hintz RL** (2002) SHOX Mutations. *Rev Endocr Metab Disord*, 3, 363-367
- Chamovitz DA, Wei N, Osterlund MT, von Arnim AG, Staub JM, Matsui M, Deng XW** (1996) The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell*, 86, 115-121
- Chandley AC** (1989) Asymmetry in chromosome pairing: a major factor in de novo mutation and the production of genetic disease in man. *J Med Genet*, 26, 546-552
- Chen CP** (2007) Syndromes and disorders associated with omphalocele (I): Beckwith-Wiedemann syndrome. *Taiwan J Obstet Gynecol*, vol.46, no.2, 96-102

- Chen J, Wildhardt G, Zhong Z, Röth R, Weiss B, Steinberger D, Decker J, Blum WF, Rappold G** (2009) Enhancer deletions of the SHOX gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J Med Genet*, 46, 834-839
- Cherniske EM, Carpenter TO, Klaiman C, Young E, Bregman J, Insogna K, Schultz RT, Pober BR** (2004) Multisystem study of 20 older adults with Williams syndrome. *Am J Med Genet*, 131A, 255-264
- Chong SS, Pack SD, Roschke AV, Tanigami A, Carrozzo R, Smith AC, Dobyns WB, Ledbetter DH** (1997) A revision of the lissencephaly and Miller-Dieker syndrome critical regions in chromosome 17p13.3. *Hum Mol Genet*, 6, 147-155
- Christian SL, Robinson WP, Huang B, Mutirangura A, Line MR, Nakao M, Surti U, Chakravarti A, Ledbetter DH** (1995) Molecular characterization of two proximal deletion breakpoint regions in both Prader-Willi and Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet*, 57, 40-48
- Jawad AF, McDonald-McGinn DM, Zackai E, Sullivan KE** (2001) Immunologic features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *J Pediatr*, 139, 715-723
- Kleinjan D-J, van Heyningen V** (1998) Position effect in human genetic disease. *Hum Mol Genet*, 7, 1611-1618
- Knight SJL, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J** (1999) Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet*, 354, 1676-1681 (*)
- Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MHA, Merkx GFM, Knoers NVAM, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CMA, de Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BBA, Sistermans EA** (2004) Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet*, 41, 892-899
- Kosho T, Muroya K, Nagaki T, Fujimoto M, Yokoya S, Sakamoto H, Hirano T, Terasaki H, Ohasha H, Nishimura G, Sato S, Matsuo N, Ogata T** (1999) Skeletal features and growth patterns in 14 patients with haploinsufficiency of SHOX: Implications for the development of Turner syndrom. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 4613-4621
- Krantz ID, Spinner NB** (2007) Novel microdeletion syndromes. *Am J Med Genet*, 145C, 323-326
- Ledbetter DH** (1992) Minireview: cryptic translocations and telomere integrity. *Am J Hum Genet*, 51, 451-456
- Leka SK, Kitsiou-Tzeli S, Kalpini-Mavrou A, Kanavakis E** (2006) Short stature and dysmorphology associated with defects in the SHOX gene. *Hormones*, 5(2), 107-118
- Lichtenstein LR, Sundaram M, Burdge R** (1980) Sex-influenced expression of Madelung's deformity in a family with dyschondrosteosis. *J Med Genet*, 17, 41-43
- Lockwood D, Hecht F, Dowman C, Hecht BK, Rizkallah TH, Goodwin TM, Allanson J** (1988) Chromosome subband 17p11.2 deletion: a minute deletion syndrome. *J Med Genet*, 25, 732-737
- Marchini A, Rappold GA, Schneider KU** (2007) SHOX at a glance: from gene to protein. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 113(3), 116-123
- Matthews AL** (1999) Chromosomal abnormalities: trisomy 18, trisomy 13, deletions, and microdeletions. *J Perinat Neonatal Nurs*, 13(2), 59-75
- Mefford HC, Trask BJ** (2002) The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat Rev Genet*, 3, 91-102
- Miozzo M, Gervasini C, Grati F, Lalatta F, De Toffol S, Gentilin B, Colapietro P, Silvia M, Frontino G, Fedele L, Dallapiccola B, Larizza L** (2010) SHOX duplications are associated with type I Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome. *Eur J Hum Genet*, 18, 20-21
- Mizuno K, Okano I, Ohashi K, Nunoue K, Kuma K, Miyata T, Nakamura T** (1994) Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif. *Oncogene*, 9, 1605-1612 (*)
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR** (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(18), 6622-6626
- Narahara K, Baker E, Ito S, Yokoyama Y, Yu S, Hewitt D, Sutherland GR, Eccles MR, Richards RI** (1997) Localization of a 10q breakpoint within the PAX2 gene in a patient with a de novo t(10;13) translocation and optic nerve coloboma-renal disease. *J Med Genet*, 34, 213-216

- Ogata T, Goodfellow P, Petit C, Aya M, Matsuo N** (1992) Short stature in a girl with a terminal Xp deletion distal to DXYS15: localisation of a growth gene(s) in the pseudoautosomal region. *J Med Genet*, 29, 455-459
- Ogata T, Matsuo N, Nishimura G** (2001) SHOX haploinsufficiency and overdosage: Impact of gonadal function status. *J Med Genet*, 38, 1-6
- Ogata T, Muroya K, Sasaki G, Nishimura G, Kitoh H, Hattori T** (2002) SHOX Nullizygosity and haploinsufficiency in a Japanese family: Implication for the development of Turner skeletal features. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 1390-1394
- Ogata T, Yoshizawa A, Muroya K, Matsuo N, Fukushima Y, Rappold G, Yokoya S** (1995) Short stature in a girl with partial monosomy of the pseudoautosomal region distal to DXYS15: Further evidence for the assignment of the critical region for a pseudoautosomal growth gene(s). *J Med Genet*, 32, 831-834
- Ohta T, Gray TA, Rogan PK, Buiting K, Gabriel JM, Saitoh S, Muralidhar B, Bilienska B, Krajewska-Walasek M, Driscoll DJ, Horsthemke B, Butler MG, Nicholls RD** (1999) Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet*, 64, 397-413
- Papavramidis ST, Kotidis EV, Gamvros O** (2006) Prader-Willi syndrome-associated obesity treated by biliopancreatic diversion with duodenal switch. Case report and literature review. *J Pediatr Surg*, 41, 1153-1158
- Petersen B, Strassburg HM, Feichtinger W, Kress W, Schmid M** (1998) Terminal deletion of the long arm of chromosome 10: a new case with breakpoint in q25.3. *Am J Med Genet*, 77, 60-62
- Pettenati MJ, Haines JL, Higgins RR, Wappner RS, Palmer CG, Weaver DD** (1986) Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of clinical and cytogenetic data on 22 new cases and review of the literature. *Hum Genet*, 74, 143-154
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung B, Gray JW, Albertson DG** (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*, 20, 207-211
- Pinkel D, Straume T, Gray JW** (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 2934-2938
- Portnoi MF, Lebas F, Gruchy N, Ardalan A, Biran-Mucignat V, Malan V, Finkel L, Roger G, Ducrocq S, God F, Taillemite JL, Marlin S** (2005) Two new familial cases with some overlapping features with DiGeorge/Velocardiofacial syndromes. *Am J Med Genet*, 137A, 47-51
- Potocki L, Shaw CJ, Stankiewicz P, Lupski JR** (2003) Variability in clinical phenotype despite common chromosomal deletion in Smith-Magenis syndrome [del(17)(p11.2p11.2)]. *Genet Med*, 5, 430-434
- Rao E, Weiss B, Fukami M, Mertz A, Meder J, Ogata T, Heinrich U, Garcia-Heras J, Schiebel K, Rappold GA** (1997a) FISH-deletion mapping defines a 270 kb short stature critical interval in the pseudoautosomal region PAR1 on the human sex chromosomes. *Hum Genet*, 100, 236-239
- Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M, Nordsiek G, Heinrich U, Breuning MH, Ranke MB, Rosenthal A, Ogata T, Rappold GA** (1997b) Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nature Genet*, 16, 54-63 (*)
- Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, Crowe BJ, Roeth R, Quigley CA, Ross JL, Niesler B** (2007) Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet*, 44(5), 306-313
- Rappold GA, Fukami M, Niesler B, Schiller S, Zumkeller W, Bettendorf M, Heinrich U, Vlachopapadopoulou E, Reinehr T, Onigata K, Ogata T** (2002) Deletions of the homeobox gene SHOX (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 1402-1406
- Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Hüffmeier U, Thiel C, Rüschemdorf F, Nürnberg P, Reis A, Trautmann U** (2006) Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet*, 140A, 2063-2074
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shaperro MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW,**

- Scherer SW, Hurles ME** (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444, 444-454
- Rooms L, Reyniers E, Kooy RF** (2005) Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. *Hum Mutat*, 25, 513-524
- Rooms L, Reyniers E, Wuyts W, Storm K, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, van den Ende J, Biervliet M, Eyskens F, van Goethem G, Laridon A, Ceulemans B, Courtens W, Kooy RF** (2006) Multiplex ligation-dependent probe amplification to detect subtelomeric rearrangements in routine diagnostics. *Clin Genet*, 69, 58-64
- Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, Oechsler H, Belohradsky B, Prieur M, Aurias A, Raymond FL, Clayton-Smith J, Hatchwell E, McKeown C, Beemer FA, Dallapiccola B, Novelli G, Hurst JA, Ignatius J, Green AJ, Winter RM, Brueton L, Brøndum-Nielsen K, Stewart F, Van Essen T, Patton M, Paterson J, Scambler PJ** (1997) Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet*, 34, 798-804
- Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G** (1992) The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 4913-4917
- Salman M, Jhanwar SC, Ostrer H** (2004) Will the new cytogenetics replace the old cytogenetics? *Clin Genet*, 66, 265-275
- Saracoglu K, Brown J, Kearney L, Uhrig S, Azofeifa J, Fauth C, Speicher MR, Eils R** (2001) New concepts to improve resolution and sensitivity of molecular cytogenetic diagnostics by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Cytometry*, 44, 7-15
- Scigliano S, Grégoire MJ, Schmitt M, Jonveaux PH, LeHeup B** (2004) Terminal deletion of the long arm of chromosome 10. *Clin Genet*, 65, 294-298
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Mánér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M** (2004) Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*, 305, 525-528
- Sellner LN, Taylor GR** (2004) MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum Mutat*, 23, 413-419
- Semina EV, Reiter RS, Murray JC** (1998) A new homeobox gene OG12X is a member of the most conserved homeobox gene family and is expressed during heart development in mouse. *Hum Mol Genet*, 7, 415-422
- Seranski P, Hoff C, Radelof U, Hennig S, Reinhardt R, Schwartz CE, Heiss NS, Poustka A** (2000) RAI1 is a novel polyglutamine encoding gene that is deleted in Smith-Magenis syndrome patients. *Gene*, 270, 69-76
- Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC** (2007) The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet*, 145C, 335-345
- Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R, Rorem E, Sundin K, Ballif BC, Bejjani BA** (2006) Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. *J Pediatr*, 149, 98-102
- Shaffer LG, Lupski JR** (2000) Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet*, 34, 297-329
- Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FF, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer LG** (1997) Chromosome 1p36 deletions: The clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet*, 61, 642-650
- Schiller S, Spranger S, Schechinger B, Fukami M, Merker S, Drop SLS, Tröger J, Knoblauch H, Kunze J, Seidel J, Rappold GA** (2000) Phenotypic variation and genetic heterogeneity in Léri-Weill syndrome. *Eur J Hum Genet*, 8, 54-62
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G** (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 30(12), e57
- Šolc R** (2008) Molekulárně genetická analýza u pacientů s podezřením na mikrodeleční syndrom. *bakalářská práce*

- Thomas NS, Harvey JF, Bunyan DJ, Rankin J, Grigelioniene G, Bruno DL, Tan TY, Tomkins S, Hastings R** (2009) Clinical and molecular characterization of duplications encompassing the human SHOX gene reveal a variable effect on stature. *Am J Med Genet*, 149A (7), 1407-1414
- Trask BJ, Mefford H, van den Engh G, Massa HF, Juyal RC, Potocki L, Finucane B, Abuelo DN, Witt DR, Magenis E, Baldini A, Greenberg F, Lupski JR, Patel PI** (1996) Quantification by flow cytometry of chromosome 17 deletions in Smith-Magenis syndrome patients. *Hum Genet*, 98, 710-718 (*)
- Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts CM, Knoers NV, van der Burgt I, de Jong PJ, Brunner HG, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Veltman JA** (2003) Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet*, 73, 1261-1270
- Vlangos CN, Yim DKC, Elsea SH** (2003) Refinement of the Smith-Magenis syndrome critical region to approximately 950 kb and assessment of 17p11.2 deletions. Are all deletions created equally? *Mol Genet Metab*, 79, 134-141
- Weksberg R, Shuman C, Smith AC** (2005) Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet*, 137C, 12-23
- Windpassinger C, Kroisel PM, Wagner K, Petek E** (2002) The human gamma-aminobutyric acid A receptor delta (GABRD) gene: Molecular characterisation and tissue-specific expression. *Gene*, 292, 25-31
- Wu YQ, Heilstedt HA, Bedell JA, May KM, Starkey DE, McPherson JD, Shapira SK, Shaffer LG** (1999) Molecular refinement of the 1p36 deletion syndrome reveals size diversity and a preponderance of maternally derived deletions. *Hum Mol Genet*, 8, 313-321
- Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, Ichida F, Joo K, Kimura M, Imamura S, Kamatani N, Momma K, Takao A, Nakazawa M, Shimizu N, Matsuoka R** (2003) Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet*, 362, 1366-1373
- Yu S, Cox K, Friend K, Smith S, Buchheim R, Bain S, Liebelt J, Thompson E, Bratkovic D** (2008) Familial 22q11.2 duplication: a three-generation family with a 3-Mb duplication and a familial 1,5-Mb duplication. *Clin Genet*, 73, 160-164
- Yunis JJ** (1981) Mid-prophase human chromosomes, the attainment of 2000 bands. *Hum Genet*, 56, 293-298 (*)
- Zenker M, Rittinger O, Grosse KP, Speicher MR, Kraus J, Rauch A, Trautmann U** (2002) Monosomy 1p36 – a recently delineated, clinically recognizable syndrome. *Clin Dysmorphol*, 11, 43-48
- Zhang X, Snijders A, Segraves R, Zhang X, Niebuhr A, Albertson D, Yang H, Gray J, Niebuhr E, Bolund L, Pinkel D** (2005) High-resolution mapping of genotype-phenotype relationships in Cri du chat syndrome using array comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet*, 76, 312-326
- Zuberi SM, Eunson LH, Spauschus A, DeSilva R, Tolmie J, Wood NW, McWilliam RC, Stephenson JP, Kullmann DM, Hanna MG** (1999) A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with partial epilepsy. *Brain*, 122, 817-820

Příloha č.1 – Mikrodeleční syndromy

V této příloze jsou formou tabulky popsány významné mikrodeleční syndromy. Několik údajů se bohužel nepodařilo dohledat. Výběr je založen na sumarizaci provedené v autorově bakalářské práci (Šolc, 2008).

Vysvětlivky :

Významné zasažené geny :

- CDKN1C (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C) ... negativní regulátor buněčné proliferace, tumor-supresorový gen (Chen, 2007)
- COPS3 (COP9 subunit 3) ... gen kódující podjednotku 3 komplexu pro převod signálu COP9 (Chamovitz et al., 1996)
- CRK ... gen kódující SH2/SH3 adaptorovou molekulu se dvojím možným alternativním sestřihem (Cardoso et al., 2003)
- ELN ... gen pro elastin (Mizuno et al., 1994 in Frangiskakis et al., 1996)
- GABRD (GABA receptor delta-subunit gene) ... gen kódující delta podjednotku receptoru pro neurotransmitter GABA (Windpassinger et al., 2002)
- H19 ... gen exprimující netranslační mRNA s tumor-supresorovou funkcí (Chen, 2007)
- IGF2 (insulin-growth factor II) ... embryonální růstový faktor a regulátor buněčné proliferace (Chen, 2007)
- KCNAB2 ... gen kódující alfa podjednotku napěťově řízeného draslíkového kanálu (Zuberi et al., 2001)
- KCNQ1 ... gen kódující protein se strukturními znaky napěťově řízených draslíkových kanálů (Chen, 2007)
- KCNQ1OT1 (KCNQ1-overlapping transcript 1) ... gen exprimující nekódující mRNA (Chen, 2007)
- LIMK1 ... gen pro Lim-kinázu 1 (Mizuno et al., 1994 in Frangiskakis et al., 1996)
- LIS1 ... gen, jehož delece je spojena s lencefalií (Chong et al., 1997)
- MYO1C ... člen rodiny myosinových motorů typu I (Cardoso et al., 2003)
- PAX2 (paired box 2) ... jeden z devíti genů PAX, jejichž postižení souvisí s chorobou ONCR (optic nerve coloboma-renal disease) (Narahara et al., 1997)
- PITPa .. gen, jehož produkt je významný pro membránový transport a signalisaci pomocí inositolových lipidů (Cardoso et al., 2003)
- PRP8 ... gen exprimující jednu z nejkonzervativnějších součástí spliceosomů (Cardoso et al., 2003)
- RAI1 ... regulátor transkripce (Seranski et al., 2000)
- RILP (Rab7-interacting lysosomal protein) ... gen kódující protein, jež se účastní vazby mezi lysosomy a dynein-dynaktinovými motory (Cardoso et al., 2003)
- SKIP (skeletal muscle and kidney enriched inositol phosphatase) ... negativní regulátor aktinového cytoskeletu (Cardoso et al., 2003)
- SNRPN ... gen kódující malé jaderné riboproteiny, součásti spliceosomů (Cassidy et al., 2000)

SREC (scavenger receptor expressed by endothelial cells) ... gen ovlivňující endocytózu modifikovaných lipoproteinů (Cardoso et al., 2003)

TBX1 ... gen pro transkripční faktor hrající významnou roli v raném vývoji obratlů (Yagi et al., 2003)

UBE3A ... gen kódující protein E6-AP, přenašeč malých ubiquitinových molekul (Cassidy et al., 2000)

14-3-3ε ... gen kódující multifunkční vnitrobuněčný protein (Cardoso et al., 2003)

Mikrodelece :

schéma : podíl postižení způsobených delecí (%), typ delece, velikost delece (% nebo obecněji)

atyp ... atypické případy

I ... vyskytuje se jako intersticiální delece

převaž ... převážná většina

T ... vyskytuje se jako terminální delece

var ... velmi variabilní

zdroje informací : M1p... Heilstedt et al., 2003; Shaffer et al., 2006; WS... Frangiskakis et al., 1996; M10q... Petersen et al., 1998; Scigliano et al., 2004; BWS... Chen, 2007; Weksberg et al., 2005; AS... Cassidy et al., 2000; Christian et al., 1995; PWS... Cassidy et al., 2000; Christian et al., 1995; SMS... Gropman et al., 2007; Potocki et al., 2003; Vlangos et al., 2003; MDS... Ledbetter et al., 1992; DGS / VCFS... Carlson et al., 1997

Jiné příčiny :

del ... delece

IC ... porucha centra imprintingu

komplex ... komplexní přestavba

mut ... mutace

UPD ... uniparentální disomie

zdroje informací : M1p... Shaffer et al., 2006; BWS... Weksberg et al., 2005; AS... Cassidy et al., 2000; Ohta et al., 1999; PWS... Cassidy et al., 2000; Ohta et al., 1999; SMS... Potocki et al., 2003; DGS / VCFS... Carlson et al., 1997

Tabulka 9 – Mikrodeleční syndromy

Syndrom	Poprvé popsán	Incidence	Klinické projevy	Postižený region	Významné zasažené geny	Mikrodelece	Jiné příčiny
Monosomie 1p36 (M1p)		1/5 000 (Heilstedt et al., 2003)	mentální a růstová retardace, porucha motoriky, faciální dysmorfie, poruchy zraku a sluchu, epilepsie, hrubé chování (Shapira et al., 1997)	1p36	GABRD, KCNAB2	52 % (T), 29 % (I), 1,5-10,5 Mb (var)	komplex (19 %)
Williamsův syndrom (WS)	1961: Williams	1/20 000 (Frangiskakis et al., 1996)	mentální retardace, výborné vyjadřovací schopnosti, prosociální chování, poruchy zraku a sluchu, kardiovaskulární choroby, diabetes, hypertyreóza (Cherniske et al., 2004)	7q11.23	ELN, LIMK1	100 %, I, < 500 kb (převaž), 83,6 kb (atyp)	---
Monosomie 10q (M10q)	1978: Lewandowski	k roku 2004 asi 50 případů (Scigliano et al., 2004)	mikrocefálie, brachycefálie, faciální dysmorfie, růstové, vývojové a mentální retardace, vady srdce a močopohlavního ústrojí (Petersen et al., 1998)	10q25-q26	PAX2	100 %, I, T, rozsah velmi variabilní	---
Beckwith-Wiedemannův syndrom (BWS)	1963: Bectwith 1964: Wiedemann	1/13 700 (Pettenati et al., 1986)	pre- nebo postnatální gigantismus, faciální dysmorfie, omfalokéla, hypoglykémie, vady srdce a ledvin, retardace, neoplazmy (Pettenati et al., 1986)	11p15 (mat)	IGF2, H19, KCNQ1, CDKN1C, KCNQ1OT1	< 50 %, I, 1 Mb (převaž)	methyl (< 50 %), UPD (20 %), mut CDKN1C (10 %)
Angelmanův syndrom (AS)	1965: Angelman	1/10 000 – 1/15 000 (Cassidy et al., 2000)	mikrocefálie, faciální dysmorfie, mentální retardace, neschopnost mluvit, návaly štěstí, hyperaktivita, hypopigmentace, epilepsie, hypotonie (Clayton-Smith et al., 2003)	15q11-q13 (mat)	UBE3A	70 %, I, 4 Mb (převaž)	mut UBE3A (10-15 %), UPD (3-5 %), IC (2-5 %)
Prader-Williho syndrom (PWS)	1956: Prader, Labhart, Willi	1/10 000 – 1/15 000 (Cassidy et al., 2000)	faciální dysmorfie, mentální retardace, poruchy chování, hyperfágie, hypotonie, prouchy endokrinního systému, hypogonadismus (Papavramidis et al., 2006)	15q11-q13 (pat)	SNRPN	70 %, I, 4 Mb (převaž)	UPD (25-28 %), IC (2-5 %)
Smith-Magenisův syndrom (SMS)	1982: Smith	1/25 000 (Greenberg et al., 1991)	mentální retardace, mikrocefálie a brachycefálie, faciální dysmorfie, poruchy zraku a sluchu, poruchy chování, poruchy spánku (Lockwood et al., 1988)	17p11.2	RAI1, COPS3	90 %, I, 1,5-9 Mb : 3,5 Mb (78 %), < 3,6 Mb (12 %), > 3,6 Mb (10%)	mut RAI1 (8 %), komplex (2 %)
Miller-Diekerův syndrom (MDS)	1963: Miller 1969: Dieker		lisencefálie typu I (agyrie), faciální dysmorfie, mentální a růstová retardace, hypotonie, malformace prstů a vnitřních orgánů (Dobyns et al., 1991)	17p13.3	LISI, PRP8, RILP, SREB, PITPa, SKIP, MYO1C, CRK, 14-3-3ε	100 %, I, T	---
DiGeorgův / Velokardiofaciální syndrom (DGS / VCFS)	1965: DiGeorge (DGS) 1978: Shprintzen (VCFS)	1/5 950 (Botto et al., 2003)	faciální dysmorfie, mentální retardace, srdeční vady, anomálie ledvin, degenerace thymu, hypokalcémie (Gedes et al., 1999; Jawad et al., 2001; Ryan et al., 1997)	22q11.2	TBX1	83 %, I, 1,5-6 Mb : 3 Mb (90 %)	del 10p13-p14, mut TBX1

Příloha č.2 – Informovaný souhlas

INFORMOVANÝ SOUHLAS PACIENTA S GENETICKÝM VYŠETŘENÍM

Cíle vyšetření

Drobné chromozomální přestavby jsou nejčastější příčinou vývoje mentální retardace a/nebo dysmorfie. Standardní cytogenetické vyšetření však často není schopné takovéto přestavby detekovat. Důsledkem je vysoké procento jedinců s mentální retardací a/nebo dysmorfii bez prokázané genetické příčiny. Znalost genetických příčin napomáhá porozumět klinickým projevům asociovaným s diagnózou. S rozvojem poznatků vzrůstá i možnost zvolit optimální individuální přístup.

Účelem tohoto vyšetření je odebrat, uchovat a použít vzorek Vaší krve za účelem genetické analýzy odpovídající Vaší diagnóze pomocí moderních metod cytogenetiky a molekulární genetiky. Váš souhlas s vyšetřením a dalším nakládáním se vzorkem krve je dobrovolný a můžete jej kdykoliv zrušit a to i bez uvedení důvodu. Váš případný nesouhlas s vyšetřením nebo s využitím získaných údajů k vědeckému výzkumu bude plně respektován a v žádném případě neovlivní poskytovanou lékařskou péči.

Co se stane s mým vzorkem (zřetelně volbu označte)

Bude Vám odebrán vzorek asi 10 ml krve. Tento vzorek bude po ukončení vyšetření:

- ☐ skladován - v DNA bance, s možností dalšího testování a to pod identifikačním číslem. Archivace vzorku umožní v budoucnu rozšířit vyšetření i na nově objevené geny, s možným vztahem k diagnóze. Se vzorkem Vaší krve bude po celou dobu uchování zacházeno jako s nosičem osobních údajů.
- ☐ zničen

Pozitivní výsledek

V případě, že ve Vašem vzorku bude zjištěna chromozomální aberace nebo jiný typ poškození genetické informace s předpokládaným vztahem k Vašemu onemocnění, budete o tomto faktu informován/a a zároveň Vám bude doporučeno vyšetření Vašich nejbližších příbuzných (rodiče, sourozenci, děti). Na Vašem uvážení však zůstává, zda o tomto faktu rodinu informujete a zprostředkujete jejich vyšetření.

Vědecké zpracování

Získané údaje budou využity k dalšímu statistickému zpracování a vědeckému zkoumání. V tomto případě budou výsledky zbaveny jakýchkoliv identifikačních údajů a nebude tedy možné nalézt spojitost mezi uvedenými výsledky a Vaší osobou.

Souhlas s genetickým vyšetřením

Potvrzuji tímto, že jsem přečetl/a a pochopil/a informace pro pacienta týkající se uvedeného vyšetření a že jsem měl/a příležitost vznést své dotazy. Svým podpisem stvrzuji, že s vyšetřením souhlasím.

Jméno pacienta.....

Podpis pacienta..... Datum.....

Jméno vyšetřujícího..... Podpis vyšetřujícího.....

Pozn. U nezletilých vyplní tento formulář jejich rodiče nebo zákonný zástupce.

Příloha č.3 – Protokol MLPA

Použitý protokol (stejný pro všechna vyšetření) :

složení kitu :

pufr pro MLPA, ligáza, ligační pufr A, ligační pufr B, pufr pro PCR, směs primerů a dNTP pro PCR, DNA-polymeráza, pufr k ředění polymerázy, směs sond

postup :

A) Denaturace DNA a hybridizace sond

- 1) 1,5 μ l DNA + 1 μ l H₂O (pokud je DNA izolovaná kitem, tak 2,5 μ l DNA)
→ 98°C / 5 min; před otevřením cycleru schladit na 25°C
- 2) přidat 0,75 μ l směsi sond + 0,75 μ l pufru pro MLPA
→ promíchat; inkubovat 1 min při 95°C; poté 16 hod při 60°C

B) Ligační reakce

- 3) snížit teplotu cycleru na 54°C, poté přidat 16 μ l ligační směsi
→ promíchat; inkubovat 54°C / 15 min; poté 98°C / 5 min

příprava ligační směsi :

- smíchat 1,5 μ l ligázového pufru A + 1,5 μ l pufru B + 12,5 μ l H₂O
- přidat 0,5 μ l ligázy a promíchat
- nutné připravit méně než hodinu před použitím a uchovávat na ledu

C) PCR reakce

- 4) smíchat 5 μ l produktu ligační reakce + 2 μ l pufru pro PCR + 13 μ l H₂O
→ zahřát na 60°C; poté přidat 5 μ l polymerázové směsi a promíchat

příprava polymerázové směsi :

- smíchat 1 μl směsi primerů a dNTP + 1 μl ředícího pufru + 2,75 μl H_2O
- přidat 0,25 μl polymerázy a promíchat
- nutné připravit méně než hodinu před použitím a uchovávat na ledu

5) vlastní PCR reakce

→ 35 cyklů : 95°C / 30 s, 60°C / 30 s, 72°C / 60 s; zakončeno 72°C / 20 min

Příloha č.4 – Protokol klasické PCR

Použitý protokol (exon 1) :

složení reakce :

pufr (PCR Buffer II – pro Ampli Taq GoldTM) ... 3,2 µl

MgCl₂ (25mM) (MgCl₂ Solution – pro Ampli Taq GoldTM) ... 2 µl

dNTP (10mM) ... 0,5 µl

primery – forward (10µM) ... 1 µl

primery – reversed (10µM) ... 1 µl

polymeráza (Ampli Taq GoldTM Polymerase) (0,5U) ... 0,4 µl

DNA ... 1,2 µl

DMSO ... 1,75 µl

voda ... 18,25 µl

celkový objem ... 30 µl

průběh reakce :

95°C / 2 min

40 cyklů :

94°C / 1 min

63°C / 30 s

72°C / 30 s

70°C / 3 min

Použitý protokol (exon 2, 2a) :

složení reakce :

pufr (PCR Buffer II – pro Ampli Taq GoldTM) ... 1,5 µl

MgCl₂ (25mM) (MgCl₂ Solution – pro Ampli Taq GoldTM) ... 0,9 µl

dNTP (10mM) ... 0,2 µl

primery – forward (10µM) ... 0,4 µl

primery – reversed (10µM) ... 0,4 µl

polymeráza (Ampli Taq GoldTM Polymerase) (0,5U) ... 0,1 µl

DNA ... 0,5 µl (po ruční izolaci) nebo 1 µl (po izolaci kitem)

voda ... 10,5 µl nebo 11 µl (dle DNA)

celkový objem ... 15 µl

průběh reakce :

95°C / 2 min

10 cyklů :

94°C / 1 min

72°C / 45 s

30 cyklů :

94°C / 1 min

69°C / 45 s

70°C / 3 min

Použitý protokol (exony 3, 4a5) :

složení reakce :

pufr (PCR Buffer II – pro Ampli Taq GoldTM) ... 1,5 µl

MgCl₂ (25mM) (MgCl₂ Solution – pro Ampli Taq GoldTM) ... 0,9 µl

dNTP (10mM) ... 0,2 µl

primery – forward (10µM) ... 0,4 µl

primery – reversed (10µM) ... 0,4 µl

polymeráza (Ampli Taq GoldTM Polymerase) (0,5U) ... 0,1 µl

DNA ... 0,5 µl (po ruční izolaci) nebo 1 µl (po izolaci kitem)

voda ... 10,5 µl nebo 11 µl (dle DNA)

celkový objem ... 15 µl

průběh reakce :

95°C / 2 min

40 cyklů :

94°C / 1 min

68°C / 30 s

72°C / 30 s

70°C / 3 min

Použitý protokol (exon 6a) :

složení reakce :

pufr (PCR Buffer II – pro Ampli Taq GoldTM) ... 3,2 µl

MgCl₂ (25mM) (MgCl₂ Solution – pro Ampli Taq GoldTM) ... 2 µl

dNTP (10mM) ... 0,5 µl

primery – forward (10µM) ... 1 µl

primery – reversed (10µM) ... 1 µl

polymeráza (Ampli Taq GoldTM Polymerase) (0,5U) ... 0,4 µl

DNA ... 1,2 µl

DMSO ... 1,75 µl

voda ... 18,25 µl

celkový objem ... 30 µl

průběh reakce :

95°C / 2 min

40 cyklů :

94°C / 1 min

68°C / 30 s

72°C / 30 s

70°C / 3 min

Použitý protokol (exon 6b) :

složení reakce :

pufr (PCR Buffer II – pro Ampli Taq GoldTM) ... 3,2 µl

MgCl₂ (25mM) (MgCl₂ Solution – pro Ampli Taq GoldTM) ... 2 µl

dNTP (10mM) ... 0,5 µl

primery – forward (10µM) ... 1 µl

primery – reversed (10µM) ... 1 µl

polymeráza (Ampli Taq GoldTM Polymerase) (0,5U) ... 0,4 µl

DNA ... 1,2 µl

DMSO ... 1,75 µl

voda ... 18,25 µl

celkový objem ... 30 µl

průběh reakce :

95°C / 2 min

40 cyklů :

94°C / 1 min

70°C / 30 s

72°C / 30 s

70°C / 3 min

Příloha č.5 – Protokol asymetrické PCR (sekvenační reakce)

Použitý protokol (stejný pro všechny exony) :

složení reakce :

sekvenační kit ... 2 µl

sekvenační primery – forwarded nebo reversed (10µM) ... 0,5 µl

produkt PCR reakce (kap. 4.2.1) ... 0,5 µl

DMSO ... 0,3 µl

voda ... 1,7 µl

celkový objem ... 5 µl

průběh reakce :

95°C / 7 min

25 cyklů :

96°C / 20 s

60°C / 10 s

72°C / 4 min

Příloha č.6 – Protokol přechištění vzorků k sekvenaci

Použitý protokol (stejný pro všechny exony) :

použité chemikálie :

roztok ethanolu (96%), roztok ethanolu (70%), formamid (bezvodný)

postup :

- 1) K 5 μ l výsledné směsi sekvenační reakce (asymetrické PCR, kap. 4.2.2) přidat 20 μ l 96% ethanolu a nechat 15 min stát při pokojové teplotě.
- 2) Stočit na centrifuze (13 000 otáček / 20 min) a poté odstříknout, aby zůstalo co nejméně supernatantu.
- 3) Přidat 60 μ l 70% ethanolu a stočit na centrifuze (13 000 otáček / 10 min).
- 4) Odstříknout, aby zbylo co nejméně supernatantu a vysušit v termobloku (95°C / 1-2 min).
- 5) Přidat 25 μ l bezvodného formamidu, nechat zdenaturovat v termobloku (95°C / 5 min) a ihned uložit do chladicího stojánku nebo do mrazáku.

Příloha č.7 – Protokol real-time PCR

Použitý protokol :

složení reakce :

SYBR Green PCR Master Mix ... 12,5 µl

primery – forward (10µM) ... 2,25 µl

primery – reversed (10µM) ... 2,25 µl

DNA ... 0,25 µl

voda ... 7,75 µl

celkový objem ... 25 µl

průběh reakce :

50°C / 2 min

95°C / 10 min

40 cyklů :

95°C / 15 s

60°C / 1 min

95°C / 15 s

60°C / 15 s

95°C / 15 s

Příloha č.8

– Pacienti vyšetření pro podezření na mikroleční syndrom

Tabulka 10

Pacienti vyšetření pro podezření na mikroleční syndrom

proband	rok narození	pohlaví	P245	P297	P036	jiné MLPA
1A	2005	F	---	---	---	
2A	2001	M	---	---	---	
3A	2002	F	---	---	---	
4A	2004	M	del 1p36.33		del 1p36	
5A	2006	M	---	---	---	
6A	2005	F	---	---	dup X/Yp	P018 : dup X/Yp SHOX
7A	2003	M	---	---	---	
8A	2005	M	---	---	---	
9A	1998	F	---	---	---	
10A	2006	F	---	---	---	
11A	1992	F	---	---	---	
12A	2006	F	---	---	---	
13A	1999	M	---	---	---	P250 : ---
14A	2006	M	---	---	---	
15A	2003	F	---	---	---	
16A	2004	M	---	---	---	
17A	2007	F	---	---	---	
18A	2005	M	---	---	---	
19A	2005	M	---	---	---	

20A	2005	M	del 7q11.2			P064 : del 7q11.2
21A	1997	F	dup 22q11			P250 : dup 22q11 A-C
22A	2007	F	del 17p13.3			P064 : del 17p13.3
23A	2002	M	---	---	---	
24A	1993	F	---	---	---	
25A	1990	F	---	---	---	
26A	2004	F	---	---	---	
27A	2000	M	---	---	---	
28A	2005	F	---	---	---	
29A	2008	F	---	---	---	P250 : ---
30A	2006	F	---	---	---	
31A	2006	F	---	---	---	
32A	2004	F	---	---	---	
33A	2006	F	---	---	---	
34A	2004	M	---	---	---	
35A	2008	M	del 15q11.2-12			
36A	2003	F	---	---	---	
37A	2002	F	---	---	---	
38A	2000	F	---	---	---	
39A	2006	M	---	---	---	
40A	2002	M	---	---	---	
41A	2001	M	---	---	---	
42A	2007	F	---	---	---	

43A	2007	F	---	---	---	
44A	2002	M	del 17p11.2			P064 : del 17p11.2
45A	2009	F	---	---	---	
46A	2005	M	---	---	---	
47A	2006	M	---	---	---	
48A	2008	M	---	---	---	
49A	2000	F	del 10p		---	P250 : del 10p GATA3 ex4
50A	2002	F	---	---	---	

M... muž

F... žena

---... negativní výsledek

probandi s pozitivním nálezem

Příloha č.9

– Pacienti vyšetření pro podezření na patologii genu SHOX

Tabulka 11

Pacienti vyšetření pro podezření na patologii genu SHOX

proband	rok narození	pohlaví	indikace	MLPA P018
1B	1991	F	ISS	del L5101
2B	2004	M	ISS	del L5101
3B	1964	F	DYS	---
4B	1966	F	ISS	---
5B	1977	M	ISS	---
6B	1994	M	ISS	del SHOX
7B	1991	M	ISS	---
8B	1993	M	ISS	del L5101
9B	1979	F	DYS	---
10B	1964	M	DYS	del regul. obl. SHOX
11B	1976	F	DYS	del SHOX
12B	1994	F	ISS	del L5101
13B	1998	F	ISS	dup PAR1, del L5101
14B	1999	F	ISS	---
15B	1996	F	ISS	---
16B	1996	F	DYS	dup PAR1
17B	1956	F	DYS	del SHOX
18B	1988	F	ISS	del L5101
19B	1997	F	ISS	del L5101

20B	2002	F	ISS	del L5101
21B	1990	F	DYS	del regul. obl. SHOX
22B	1977	F	ISS	---
23B	1980	F	ISS	---
24B	1998	F	DYS	del SHOX
25B	2000	F	ISS	---
26B	1996	M	ISS	---
27B	1998	F	ISS	---
28B	1993	F	ISS	---
29B	2001	M	ISS	---
30B	1995	M	ISS	---
31B	1997	M	ISS	---
32B	1995	F	ISS	---
33B	1994	F	DYS	del SHOX, del L5101
34B	1998	F	DYS	del SHOX
35B	1999	F	ISS	---
36B	2000	F	ISS	---
37B	1995	F	ISS	---
38B	1997	F	DYS	---
39B	1979	F	ISS	---
40B	1997	M	ISS	---

M... muž

F... žena

---... bez nálezu

regul. obl.... regulační oblasti

DYS... dyschondrosteóza

ISS... idiopatický malý vzrůst (idiopathic short stature)

probandi s delecí genu SHOX nebo jeho regulačních oblastí
probandi s duplikací v regionu PAR1
probandi s izolovanou delecí sondy L5101

Příloha č.10 – Vyšetření referenční skupiny

Tabulka 12

Vyšetření referenční skupiny

	pohlaví	rozdíl c_t	nález		pohlaví	rozdíl c_t	nález		pohlaví	rozdíl c_t	nález
K1	F	-0,24	NEG	19	F	0,04		37	F	0,19	
1	F	-0,24		20	F	0,06		38	F	0,20	
2	F	-0,19		21	F	0,09		39	M	0,20	
3	F	-0,18		22	F	0,09		40	F	0,22	
4	F	-0,13		23	F	0,09		41	F	0,23	
5	F	-0,11		24	F	0,10		42	M	0,23	
6	F	-0,11		25	F	0,11		43	F	0,24	
7	F	-0,07		26	M	0,12		K3	F	0,25	NEG
8	F	-0,06		27	M	0,13		K4	F	0,25	NEG
9	F	-0,06		28	F	0,13		44	F	0,25	
10	F	-0,05		29	F	0,14		45	F	0,26	
11	F	-0,05		30	M	0,14		46	M	0,28	
12	F	-0,02		31	F	0,15		47	F	0,28	
13	F	0,00		32	M	0,15		K5	M	0,29	NEG
14	F	0,01		33	F	0,16		48	F	0,31	
15	F	0,01		34	F	0,16		49	F	0,32	
16	F	0,02		35	F	0,17		50	F	0,33	
17	F	0,03		36	F	0,17		51	F	0,34	
18	F	0,03		K2	F	0,19	DEL	52	F	0,35	

K6	M	0,36	NEG	73	F	0,60		93	M	0,80	
53	M	0,37		K9	F	0,61	NEG	94	F	0,80	
54	F	0,38		74	M	0,63		95	M	0,81	
55	M	0,39		75	M	0,63		96	M	0,82	
56	F	0,41		76	M	0,64		97	M	0,83	
K7	F	0,42	NEG	77	M	0,64		98	F	0,88	
57	F	0,42		78	M	0,66		99	M	0,90	
58	F	0,45		79	M	0,66		K12	F	0,90	DEL
59	M	0,46		K10	M	0,66	DEL	100	M	0,93	
60	M	0,47		K11	M	0,66	NEG	101	M	0,93	
61	F	0,47		80	M	0,67		102	M	0,97	
62	M	0,47		81	F	0,70		103	F	0,99	
63	M	0,49		82	M	0,72		104	M	1,00	
64	M	0,54		83	M	0,72		105	M	1,01	
65	M	0,55		84	F	0,72		106	M	1,17	
66	M	0,55		85	M	0,74		107	F	1,18	
67	F	0,56		86	M	0,76		108	M	1,19	
K8	F	0,56	DEL	87	M	0,77		109	M	1,20	
68	F	0,57		88	M	0,77		110	M	1,21	
69	F	0,59		89	M	0,78		111	M	1,24	
70	M	0,59		90	M	0,78		112	M	1,25	
71	M	0,60		91	M	0,78		113	M	1,26	
72	M	0,60		92	M	0,79		114	M	1,33	

K13	F	1,48	NEG	118	M	2,30		K17	F	2,63	DEL
115	M	1,66		K14	M	2,32	DEL	119	M	3,26	
116	M	1,89		K15	F	2,40	DEL	120	M	3,77	
117	M	2,02		K16	F	2,52	DEL	K18	F	4,09	2DEL

M... muž

F... žena

NEG... negativní nález, bez delece

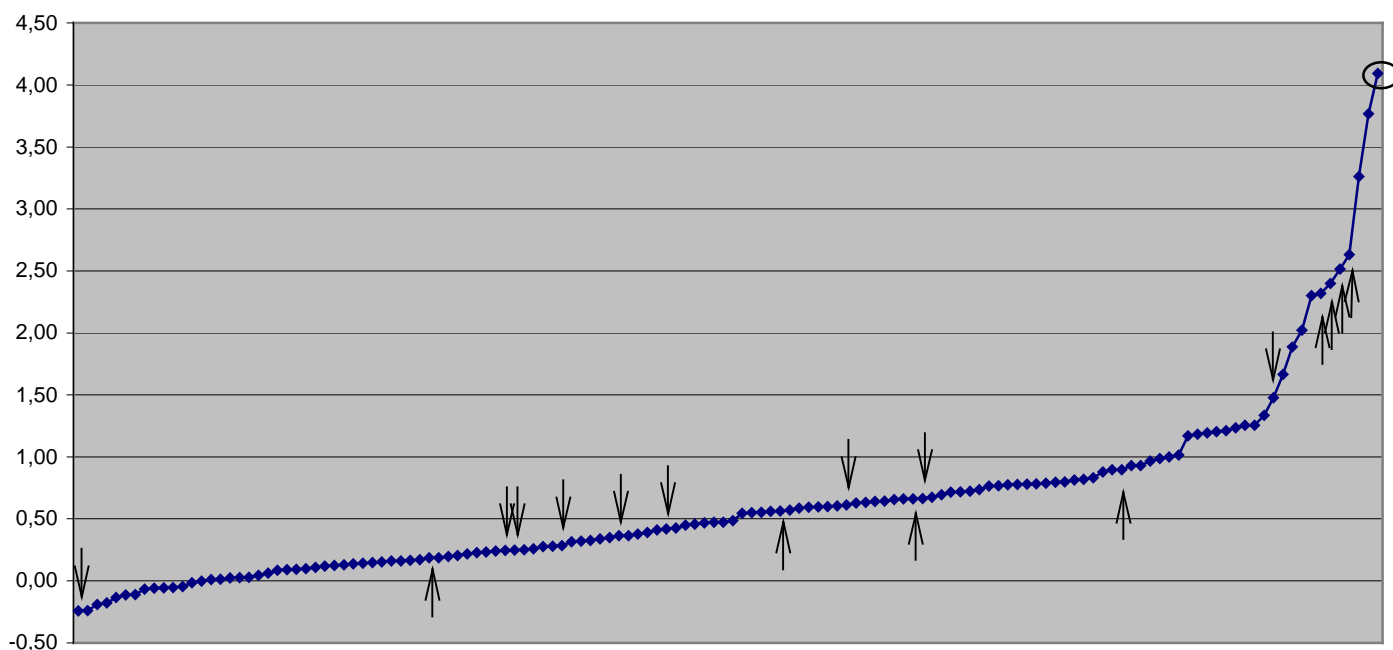
DEL... delece v heterozygotním stavu

2DEL... delece v homozygotním stavu

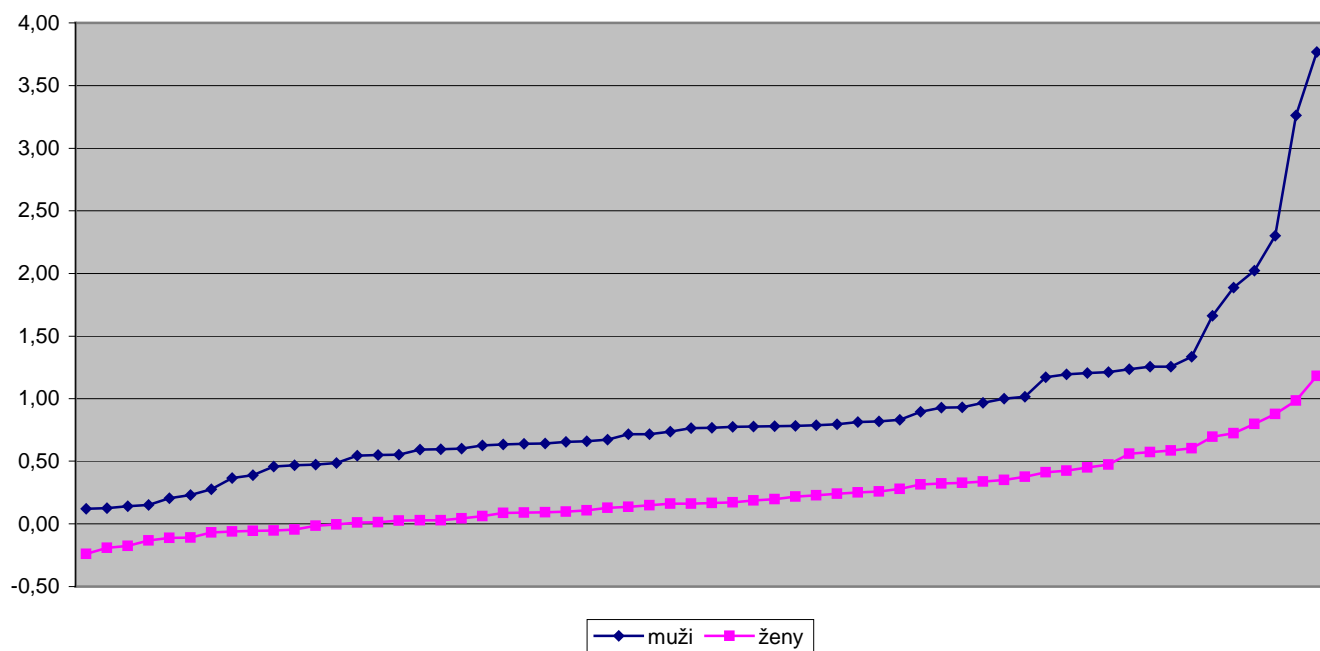
Vyšetření jedinci jsou řazeni dle rozdílu hodnot c_t , jedinci označení písmenem „K“ pochází z našeho vyšetřovaného souboru a plní tedy funkci vnitřních kontrol.

Graf 1

Vyšetření referenční skupiny



Šipky označují pozici vnitřních kontrol. Šipky směřující dolů označují jedince bez delece, šipky směřující nahoru označují jedince s delecí v heterozygotním stavu. Zakroužkovaný jedinec je nositelem delece v homozygotním stavu. Na ose Y jsou vyneseny rozdíly hodnot c_t .

Graf 2*Referenční skupina rozdělená dle pohlaví*

Příloha č.11 – Indikační protokol

Dotazník pro vyšetření genu *SHOX* (OMIM: 312865, Xpter-p22.32)

Jméno a příjmení:

Rozená: Rodné číslo: Pojišť'ovna:

Adresa:

Výška: Percentil: Výška matky: Výška otce:

Kritéria pro rozsah vyšetření:

- V případě skóre **pod 4** body bude provedena pouze analýza metodou **MLPA** (detekce delecí/duplikací v PAR1).
- V případě skóre **4 a více bodů** bude provedeno kombinované vyšetření metodou **MLPA** a **sekvenace** kódující oblasti *SHOX* genu (exony 2-6a/6b)

<u>Symptom</u>		<u>Skóre</u> [*]			
Poměr rozpětí paží/výška	< 0,965	2	ano <input type="checkbox"/>	ne <input type="checkbox"/>	neměřeno <input type="checkbox"/>
Poměr výšky v sedě/ve stoje	> 0,555	2	ano <input type="checkbox"/>	ne <input type="checkbox"/>	neměřeno <input type="checkbox"/>
Madelungova deformita					
u probanda <input type="checkbox"/>	nebo v rodině <input type="checkbox"/>	6	ano <input type="checkbox"/>	ne <input type="checkbox"/>	nevyšetřeno <input type="checkbox"/>
Cubitus valgus		2	ano <input type="checkbox"/>	ne <input type="checkbox"/>	nevyšetřeno <input type="checkbox"/>
Zkrácené předloktí		3	ano <input type="checkbox"/>	ne <input type="checkbox"/>	nevyšetřeno <input type="checkbox"/>
Vyklenuté předloktí		3	ano <input type="checkbox"/>	ne <input type="checkbox"/>	nevyšetřeno <input type="checkbox"/>
Příznaky svalové hypertrofie		3	ano <input type="checkbox"/>	ne <input type="checkbox"/>	nevyšetřeno <input type="checkbox"/>
Dislokace ulny (v lokti)		5	ano <input type="checkbox"/>	ne <input type="checkbox"/>	nevyšetřeno <input type="checkbox"/>

*

skórovací systém vychází z klinické studie Rappold et al. (Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, Crowe BJ, Roeth R, Quigley CA, Ross JL, Niesler B. Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. J Med Genet. 2007 May;44(5):306-13.)

Podpis a adresa ošetřujícího lékaře, vč. IČZ, nákladového střediska, č. odbornosti:

Datum: